

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. Mai 2001 (25.05.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/36614 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/00 9, 82319 Starnberg (DE). GRAF, Marcus [DE/DE]; Spiegelgasse 3 b, 93047 Regensburg (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/04073 (74) Anwälte: BETTENHAUSEN, Berthold usw.; Dehmel & Bettenhausen, Müllerstrasse 1, 80469 München (DE).
- (22) Internationales Anmeldedatum: 16. November 2000 (16.11.2000) (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 199 55 089.1 16. November 1999 (16.11.1999) DE (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): GENEART GMBH GESSELLSCHAFT FÜR ANGEWANDTE BIOTECHNOLOGIE [DE/DE]; Ahornstrasse 12, 93080 Pentling (DE).
- (71) Anmelder und (72) Erfinder: SHAO, Yiming [CN/CN]; 27 Nan Wie Avenue, Beijing Xuan Wu Qu 1000050 (CN).
- (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WAGNER, Ralf [DE/DE]; Franz-von-Taxis-Ring 59, 93949 Regensburg (DE). WOLF, Hans [DE/DE]; Josef Jägerhuberstrasse
- Veröffentlicht:
— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: THE GENOME OF THE HIV-1 INTER-SUBTYPE (C/B') AND USE THEREOF

(54) Bezeichnung: DAS GENOM DES HIV-1 INTERSUBTYP (C/B') UND SEINE ANWENDUNGEN

(57) Abstract: The invention relates to a polynucleotide, comprising a nucleic acid sequence according to SEQ ID NO:1, 2 or 3, fragments or derivatives thereof, or a polynucleotide hybridised with the nucleic acid sequence according to SEQ ID NO:1, 2 or 3. The invention further relates to polypeptides coded from said nucleotide sequence, or fragment, or derivative of the nucleic acid sequence according to SEQ ID NO:1, 2 or 3. The polynucleotides and polypeptides may be used as medicaments, vaccines or diagnostics, in particular for the treatment, prophylaxis and diagnosis of HIV infections.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Polynukleotid, umfassend eine Nukleinsäuresequenz gemäss SEQ ID NO:1, 2 oder 3 oder dessen Fragment oder Derivat, oder ein Polynukleotid, das mit der Nukleinsäuresequenz gemäss SEQ ID NO:1, 2 oder 3 hybridisiert. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Polypeptide, kodiert von der Nukleotidsequenz oder Fragment oder Derivat der Nukleotidsequenz gemäss SEQ ID NO:1, 2 oder 3. Die Polynukleotide und Polypeptide können als Arzneimittel, Impfstoffe oder Diagnostika, insbesondere für die Behandlung, Prävention und Diagnose von HIV-Infektionen, verwendet werden.

WO 01/36614 A2

5

Das Genom des HIV-1 Intersubtyps (C/B') und seine Anwendungen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Polynukleotid, umfassend eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:1, 2 oder 3 oder dessen Fragment oder Derivat, oder ein Polynukleotid, das mit der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:1, 2 oder 3 hybridisiert. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Polypeptide, kodiert von der Nukleotidsequenz oder Fragment oder Derivat der Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO:1, 2 oder 3. Die Polynukleotide und Polypeptide können als Arzneimittel, Impfstoffe oder Diagnostika, insbesondere für die Behandlung, Prävention und Diagnose von HIV-Infektionen, verwendet werden.

15

In Anbetracht des Ausmaßes und der globalen Verbreitung der durch das humane Immundefizienz Virus (HIV) verursachten Pandemie mit einer, bis zum Ende dieses Jahrhunderts, geschätzten Anzahl von weltweit mehr als 40 Millionen Infizierten (davon mehr als 90% in Entwicklungsländern) stellt die Entwicklung einer wirksamen HIV-Vakzine eine der größten Herausforderungen an die moderne industrialisierte Welt dar. Bislang wird die Entwicklung eines erfolgreichen HIV-Impfstoffs jedoch noch immer durch die komplizierte Biologie des Virus sowie seine komplexe Interaktion mit dem Immunsystem des Wirtes limitiert. Die wenigen Impfstoff-Kandidaten, die bis zum heutigen Zeitpunkt in Entwicklungsländern in Phase 3-Studien ausgetestet wurden, basierten hauptsächlich auf den externen Glykoproteinen gp120 oder gp160 von HIV Typ-1. Der Ausgang der Studien war jedoch eher enttäuschend: Die Impfstoffe waren nicht nur nicht in der Lage, breit kreuz-neutralisierende Antikörper- und T-Zell-Reaktionen hervorzurufen. Sie konnten nicht einmal Infektionsdurchbrüche verhindern, die bei einigen Impfungen beobachtet worden sind. Einer der Gründe für dieses Versagen liegt sicherlich in den extensiven Sequenzvariationen zwischen den verwendeten Antigenen, welche von laboradaptierten Virusstämmen abstammten, und den genetisch divergenten Viren, welche in den Testregionen (z.B. Thailand) kursierten.

10

Phylogenetische Analysen der weltweit zirkulierenden HIV-Stämme haben eine Hauptgruppe (M) mit 10 verschiedenen Sequenz-Subtypen (A-J) (Kostrakis *et al.* 1995; Leitner und Albert,

- 1995; Gaywee *et al.* 1996; World Health Organisation Network for HIV Isolation and Characterization, 1994), die im Hüllprotein Sequenzvariationen von bis zu 24 % aufweisen, und außerdem die Viren der O-Gruppe identifiziert, die sich in einigen Leserahmen um mehr als 40 % von den Viren der M-Gruppe unterscheiden (Loussert Ajaka *et al.* 1995; Myers *et al.* 1996; 5 Sharp *et al.* 1995; Sharp *et al.* 1999). Zudem entwickelt sich HIV durch die rasche Anhäufung von Mutationen und Intersubtyp-Rekombinationen immer weiter. Unterschied-liche Subtypen, welche innerhalb der Population einer geographischen Region kozirkulieren, stellen die molekulare Grundlage für die Erzeugung und Ausbreitung von gruppenübergreifenden Intersubtyp-Mosaikviren dar. Obwohl die weltweit verbreiteten HIV-1-Varianten durch Serologie 10 und Heteroduplex-DNA-Analysen intensiv untersucht wurden, beruhen die meisten phylogenetischen Analysen auf Sequenzen des Hüllproteins, da für viele der prävalenten Subtypen und eine Vielzahl von rekombinanten Formen keine vollsequenzierten Genome vorliegen.
- 15 Für die überwiegende Mehrheit der weltweit neuen HIV-1-Infektionen sind Viren des Subtyps Non-B (also *Nicht-B*-Varianten) verantwortlich. Den Viren des Subtyps C fällt dabei im Hinblick auf die Gesamtzahl von Infizierten sowie der weiten Verbreitung von Neu-Infektionen, insbesondere in Süd-Amerika und Asien, eine herausragende Rolle zu. Auf Grund dessen hat die Charakterisierung von Viren des Subtyps C eine herausragende Priorität für diagnostische, 20 therapeutische oder präventive Zwecke.

- Mit Ausnahme von Thailand lagen bis vor kurzem nur begrenzte Informationen über die Verteilung und molekulare Charakteristik von in Asien vorkommenden HIV-1-Stämmen vor. Nach Schätzungen der WHO breitet sich HIV am schnellsten in Süd- und Südost-Asien aus, 25 welche schon bald die weltweit größte Region mit HIV-Epidemie sein wird. China unterliegt ähnlichen sozialen und ökonomischen Strukturen und unterhält zu diesen Regionen unmittelbare ethnische und wirtschaftliche Verbindungen. In vielen Provinzen Chinas konnte seit Anfang 1995 ein rasanter Anstieg von HIV-Infektionen beobachtet werden. Verglichen mit allen von 1985 bis 1994 dokumentierten 1774 Fällen an HIV und AIDS, wurden im Jahr 1995 alleine 30 schon 1421 Fälle und im Jahr 1997 mehr als 4000 Fälle nachgewiesen. Die WHO geht von mehr als 400.000 HIV-Infektionen in China bis Ende 1997 aus, mit bis dahin 6400 Todesfällen und einer geschätzten Anzahl von 4000 Todesfällen allein im Jahre 1997. Im kürzlich

veröffentlichten nationalen HIV-Molekularepidemiologischen Bericht wurde gefunden, daß die Thai-Stämme des Prototyp-Subtyps B und des Subtyps B' in Yunnan, einer Provinz im Südwesten von China, die angrenzt an das Drogendreieck von Myanmar, Laos und Thailand (Graf et al. 1998), durch Benutzer von Drogen und durch Sammelstellen für kontaminiertes Blut und Plasma bis nach Zentral- und Ost-China verbreitet wurden. In den frühen 90er Jahren wurde dann in die gleiche Region eine zweite Epidemie eingeschleppt, sehr wahrscheinlich durch mit Stämmen des Subtyps C infizierte indische IDUs (intravenous drug user), also Menschen aus Indien, die Drogen intravenös verwenden (Luo et al. 1995; Shao et al. 1999). Innerhalb weniger Jahre verbreiteten sich die Viren des Subtyps C durch Drogenschmuggel schnell in Süd-, Zentral- und sogar in Nordwest-China und verursachten eine weitere Verbreitung der Epidemie innerhalb Chinas. Einem kürzlich veröffentlichten nationalen HIV-Molekularepidemiologischen Untersuchungsbericht zufolge sind fast alle mit Viren des Subtyps C infizierten Personen IDUs und machen damit etwa 40% aller HIV-infizierten IDUs in China aus. Das legt nahe, daß die Viren des Subtyps C zu den wichtigsten Subtypen von HIV-1 zählen, die unter IDUs in China prävalent sind (Shao et al. 1998, Shao et al. 1994).

Dies legt nahe, daß sich die HIV-Epidemie unter den IDUs in China innerhalb weniger Jahre von einem einzelnen vorherrschenden Subtyp (B) auf mindestens 2 vorherrschende Subtypen, B-Thai und C, ausgeweitet hat, was die Möglichkeit der Intersubtyp-Rekombination erhöht. Nach unserem bisherigen Kenntnisstand über Variabilität und Antigenizität unterschiedlicher Virus-Stämme sollten Diagnostika, Therapeutika und Impfstoffe auf regionale Virus-Stämme angepasst sein. Die Anzahl molekularer Reagenzien für Viren des Nicht-B-Subtyps sind jedoch noch extrem limitiert. Außer für Viren des Subtyps B oder C sind bislang nur wenige nicht-rekombinante molekulare Klone und wenige Mosaikgenome verfügbar. Was HI-1-Viren des Subtyps C betrifft, sind bislang nur nicht-rekombinante Vertreter und vier A/C-Rekombinanten publiziert, die alle aus Afrika, Süd-Amerika oder Indien stammen (Luo et al. 1995; Gao et al. 1998; Lole et al. 1999). Darüberhinaus beschränken sich die bislang gesammelten Daten über Viren des Subtyps C in China auf genetische Subtypisierungen des env-Gens (Luo et al. 1995; Yu et al. 1997; Salminen et al. 1995).

30

Mehrere klinische Studien zur Bekämpfung von HIV-Infektionen wurden bislang mit Vakzinen durchgeführt. Die enttäuschenden Ergebnisse, die bei klinischen Studien beobachtet wurden,

beinhalten wiederholt berichtete Infektionsdurchbrüche bei den Impfungen. Dies wurde vor allem auf die umfangreichen Sequenzvariationen zwischen den verabreichten Hüllproteinen und dem infektiösen Input-Virus zurückgeführt, was tatsächlich vorwiegend auf eine unzureichende Charakterisierung der in einer bestimmten geographischen Region zirkulierenden Viruspopulation zurückzuführen ist. Dies resultierte in der Erzeugung von humoralen und - in geringerem Ausmaß - von zellvermittelten Immunantworten gegen virale Antigene, welche nicht relevant waren für die in der Population des Testgebietes zirkulierenden Viren. Zudem konnte gezeigt werden, daß gering affine, spezifisch gegen das Hüllprotein gerichtete Antikörper nicht nur keine neutralisierenden Eigenschaften besitzen, sondern darüberhinaus sogar zu einer Verstärkung der Infektion mittels Komplement- oder Fc-Rezeptor beitragen. Desweiteren erwiesen sich die ausgewählten Antigene und Ver-abreichungssysteme als extrem schwach für die Induktion der zellvermittelten Immunantwort.

Angesichts eines Mangels an genauer Kenntnis über Subtyp-übergreifende protektive Immunantworten sowie über die komplexe Situation in Entwicklungsländern, wo bekanntermaßen viele Subtypen von HIV-1 ko-zirkulieren, sollten Impfstoff-Präparationen Mischungen von repräsentativen Antigenen enthalten. Somit besteht also ein Bedarf an der Isolierung und Charakterisierung von Viren des Subtyps C, insbesondere für die Klonierung der kodierenden Region.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung wird durch den in den Patentansprüchen definierten Gegenstand gelöst.

Die nachfolgenden Figuren erläutern die vorliegende Erfindung.

Figur 1 zeigt eine Darstellung der phylogenetischen Verwandtschaft der das env-Gen C2V3 kodierenden Region des Klons 97cn54 zu den Vertretern der wichtigen Subtypen von HIV-1 (M-Gruppe). "cn-con-c" steht für die env-Konsensussequenz der HIV-1-Stämme des Sub-typs C, welche in China prävalent sind. Der phylogenetische Stammbaum wurde mittels der "*neighbour joining*"-Methode erstellt. Die Werte an den Knoten geben die "*bootstraps*" in % an, welche die Eingruppierung rechts unterstützt. Nur "*bootstrap*"-Werte, die 70% erreichen oder überschreiten, sind angegeben. Die Klammern rechts stellen die Sequenzen der wichtigsten Subtypen von

HIV-1, M-Gruppe, dar.

Figur 2 zeigt eine Darstellung der RIP-Analyse (Recombinant Identification Program), Version 1.3, des gesamten für gagpol kodierenden Bereichs von 97cn54 (Fenstergröße: 200, 5 Schwellenwert für die statistische Signifikanz: 90%, Umgang mit Lücken: STRIP). Die Positionen der offenen Leserahmen von gag und pol sind durch Pfeile im Diagramm oben dargestellt. Die RIP-Analyse basierte auf Hintergrundvergleichen unter Verwendung von Referenzsequenzen, die von ausgewählten Virus-Stämmen abstammten, die die wichtigsten Subtypen von HIV-1 darstellen. Standardvertreter sind durch verschiedene Farben markiert, wie 10 angezeigt. Die x-Achse gibt die Nukleotid-Positionen entlang des Sequenzvergleichs an. Die y-Achse gibt die Ähnlichkeit von 97cn54 mit den aufgelisteten Referenz-Subtypen an.

Figur 3 zeigt eine Darstellung der phylogenetischen Verwandtschaft verschiedener Regionen innerhalb der von 97cn54 abgeleiteten Leserahmen von gagpol mit Standard-Vertretern der 15 wichtigsten Subtypen von HIV-1 (M-Gruppe). Unter Verwendung der "*neighbour joining*"-Methode basierend auf den folgenden Sequenzabschnitten: (A) Nukleotide 1-478, (B) 479-620, (C) 621-1290, (D) 1291-1830, (E) 1831-2220, (F) 2221-2520 und (G) 2521-2971 wurden phylogenetische Stammbäume erstellt. Die angegebenen Positionen beziehen sich auf das erste Nukleotid des offenen Leserahmens von gag. Graue Bereiche kennzeichnen Cluster der 20 analysierten Sequenzen entweder mit von Subtyp C (A, C, E, G) oder von Subtyp B (B, D, F) abgeleiteten Referenzstämmen. Die Werte an den Knoten geben die "*bootstrap*"-Werte in Prozent an, durch die das Cluster rechts bestätigt wurde. Es werden nur "*bootstrap*"-Werte von 70% oder mehr gezeigt.

25 Figur 4 zeigt eine Darstellung der RIP-Analyse, Version 1.3, von verschiedenen Regionen von 97cn54 (Fenstergröße: 200, Schwellenwert für die statistische Signifikanz: 90%, Umgang mit Lücken: STRIP). Die Analyse umfaßte (A) einen Sequenzbereich von 1500 bp Länge vom Startkodon des vif-Gens bis zum 5'-Ende von env einschließlich vif, vpr, dem ersten Exon von tat und rev, vpu und den ersten 200 bp des env-Gens und (B) ein etwa 700 bp langes Fragment, 30 das 300 bp vom 3'-Ende von env, die das komplette nef-Gen und Teile der 3'-LTR-Region umfassen, überlappt. Die Positionen der Startkodons vpr, tat, vpu, env, nef und das 5'-Ende der 3'-LTR-Region sind jeweils oben in den Diagrammen durch Pfeile gekennzeichnet. Die RIP-

Analyse basierte auf Hintergrund-Vergleichen unter Verwendung von Sequenzen, die von ausgewählten Virusstämmen abgeleitet waren, die die wichtigsten Subtypen von HIV-1 repräsentierten. Die angegebenen Standardvertreter sind durch verschiedene Farben gekennzeichnet. Die x-Achse gibt die Nukleotidpositionen entlang des Sequenzvergleichs an. Die y-Achse gibt die Ähnlichkeit von 97cn54 mit den aufgelisteten Referenz-Subtypen an. (C) und (D) zeigen RIP-Analysen von Sequenzen von zwei unabhängigen C-Isolaten (xj24 und xj158) aus China, die das vpr- und vpu-Gen einschließlich des ersten Exons von tat überlappen.

Figur 5 zeigt die Analyse eines phylogenetischen Stammbaums. Phylogenetische Stammbäume wurden unter Verwendung der "*neighbour joining*"-Methode erstellt basierend auf (A) einem 380 bp langen Fragment, das 150 bp vom 3'-Ende des vpr-Gens bis zum Ende des vpu-Leserahmens überlappt, (B) den ersten 290 bp der kodierenden Region von nef und (C) auf den 320 bp am 3'-Ende des nef-Gens. Die Werte an den Knoten geben die "*bootstrap*"-Werte in Prozent an, durch die das Cluster rechts bestätigt wurde. Es werden nur "*bootstrap*"-Werte von 70% oder mehr gezeigt. Die Klammern rechts stellen die wichtigsten Subtyp-Sequenzen von HIV-1, Gruppe M, dar.

Figur 6 ist eine schematische Darstellung der mosaikartigen Organisation des Genoms von 97cn54.

Figur 7 ist eine Darstellung des Vergleichs zwischen bekannten und experimentell nachgewiesenen CTL-Epitopen des Prototyps B (HIV-1_{LA1}) und den entsprechenden Aminosäure-Sequenzen der Polypeptide gag, pol und env des Stammes 97cn54 vom Subtyp C. Die funktionellen Domänen in GAG (p17 Matrix, p24 Kapsid, p15 Nukleokapsid und Linker-Protein), POL (PR Protease, RT Reverse Transkriptase, IN Integrase) und ENV (gp120 äußeres Glykoprotein, gp41 Transmembranprotein) sind entsprechend bezeichnet. Die Zahlen unterhalb der offenen Leserahmen geben die Aminosäure-Position relativ zu den aminoterminalen Enden der Polypeptide an. Haplotyp-Restriktionen der bekannten CTL-Epitope von HIV-1_{LA1} sind am linken bzw. rechten Rand angegeben. Die grünen Balken kennzeichnen Sequenz-Identität zwischen dem bekannten Epitop und der entsprechenden Sequenz vom Subtyp C, blaue Balken bedeuten 2 oder weniger konservative Fehlpaarungen. Rote Balken stellen vom Subtyp C abgeleitete Sequenz-Bereiche mit mehr als 2 konservativen Fehlpaarungen oder nicht-

konservative Substitutionen im Vergleich zu dem entsprechenden von LAI abgeleiteten Epitop dar.

Figur 8 zeigt die vollständige kodierende Nukleotidsequenz von 97cn54 von HIV-1, Subtyp C (SEQ ID NO:1), mit den entsprechenden Aminosäuren im Einbuchstaben-Kode. Alle 3 Leserahmen sind angegeben. Die Sternchen stellen Stopp-Kodons dar.

Figur 9 zeigt in einer Darstellung das Ergebnis der Aktivitäten zytotoxischer T-Zellen in Milzzellen von BALB/c Mäusen nach intramuskulärer Immunisierung mit den angezeigten DNA-Plasmiden. Lymphoide Zellen, gewonnen 3 Wochen nach der Primärimmunisierung aus jeweils 5 Mäusen pro Gruppe, wurden mit AMQMLKETI (Einbuchstabencode) Gag-Peptid beladenen syngen P815 Mastozytom Zellen (bestrahlt mit 20,000 rad) kokultiviert. Kontrollen schlossen Milzzellen nicht-immunisierter Mäuse, stimuliert mit Peptid-beladenen P815 Zellen ein. Zytotoxische Effektor-Zellpopulationen wurden nach einer 5-tägigen Kultur *in vitro* geerntet. Die zytotoxischen Antworten wurden gegen A20 Zellen, beladen mit dem oben aufgeführte nonameren Peptid oder gegen unbeladene A20 Zellen, in einem Standard ⁵¹Cr Freisetzungstest ausgelesen. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mittelwerte aus jeweils Dreifachansätzen. Die ermittelten Standardabweichungen lagen jeweils unter 15% gemessen am Mittelwert.

Die Begriffe "Epitop" oder "Antigene Determinante", wie nachfolgend verwendet, bedeuten eine immunologisch determinante Gruppe eines Antigens, das spezifisch von einem Antikörper erkannt wird. Ein Epitop kann Aminosäuren in räumlicher oder diskontinuierlicher Konformation umfassen und umfaßt mindestens 3, vorzugsweise mindestens 5, Aminosäuren. Ein Epitop kann auch ein einzelnes Segment einer Polypeptid-Kette umfassend eine kontinuierliche Aminosäure-Sequenz umfassen.

Der Begriff "Polynukleotid", wie nachfolgend verwendet, bezieht sich auf ein einzel- oder doppelsträngiges Heteropolymer aus Nukleotid-Einheiten beliebiger Länge, wobei diese entweder Ribo- oder Desoxyribonukleotide sein können. Der Begriff umfaßt auch modifizierte Nukleotide.

Der Begriff "Derivat", wie nachfolgend verwendet, bezeichnet eine Nukleinsäure, die ebenfalls das oder die Polypeptide kodiert, die von einer anderen Nukleotidsequenz kodiert werden, obwohl sich ihre Nukleotidsequenz von der anderen Nukleotidsequenz unterscheidet. In diesem Sinne bezeichnet der Ausdruck „Derivat“ auch Äquivalente der anderen Nukleotidsequenz, die aufgrund der Degeneration des genetischen Codes vorliegen. Unter den Begriff Derivat fallen z.B. Nukleinsäuren, die die gleichen Polypeptide wie die Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO:1, 2 oder 3 kodieren, aber eine andere Nukleotidsequenz aufweisen, oder es fallen ferner Nukleinsäure-Fragmente unter den Begriff, die das gleiche Polypeptid kodieren wie Nukleinsäure-Fragmente der Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO:1, 2 oder 3.

10

Der Begriff "Polypeptid", wie nachfolgend verwendet, bezieht sich auf eine Kette von mindestens 2 Aminosäure-Resten, die durch Peptidbindungen miteinander verbunden sind. Der Begriff umfaßt daher alle Aminosäure-Ketten, z.B. Oligopeptide und Proteine. Der Begriff bezieht sich auch auf solche Aminosäure-Ketten, bei denen eine oder mehrere Aminosäure(n) modifiziert ist(sind), z.B. durch Acetylierung, Glykosylierung oder Phosphorylierung.

15

Der Begriff "kontinuierliche Sequenz" und "Fragmente", wie nachfolgend verwendet, bezieht sich auf einen linearen Abschnitt von Nukleotiden oder Aminosäuren, der von einer Referenz-Sequenz stammt, z.B. von den Sequenzen der vorliegenden Erfindung, wie sie in dem Sequenzprotokoll wiedergegeben sind.

20

Der Begriff "selektive Hybridisierung" bzw. "selektiv hybridisierbar", wie nachfolgend verwendet, bezieht sich auf Hybridisierungsbedingungen, bei denen zwei Polynukleotide unter stringenten Hybridisierungsbedingungen Duplex-Nukleotidmoleküle bilden. Diese Bedingungen sind im Stand der Technik bekannt und z.B. in Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory (1989), ISBN 0-87969-309-6 beschrieben. Beispiele für stringente Hybridisierungsbedingungen sind: (1) Hybridisierung in 4 x SSC bei 65°C oder (2) Hybridisierung in 50% Formamid in 4 x SSC bei 42°C, jeweils gefolgt von mehreren Waschschritten in 0,1 x SSC bei 65°C (1 Stunde lang).

25

30

Der Begriff "viraler Vektor" oder "bakterieller Vektor", wie nachfolgend verwendet, bezieht sich auf gentechnisch veränderte Viren oder Bakterien, mit denen sich die in den SEQ ID NO:1, 2

oder 3 ausgeführten DNA-Sequenzen, davon abgeleitete Derivate, Fragmente, Sequenzen kodierend für Epitope oder Epitop-Strings in unterschiedliche Zellen, bevorzugt in antigenpräsentierende Zellen wie beispielsweise Dendritische Zellen einbringen lassen. Ein bakterieller Vektor kann darüber hinaus geeignet sein, ein von SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 kodierte

5 Polypeptid, davon abgeleitete Epitope oder Epitop-Strings direkt zu exprimieren.

Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft eine Nukleotidsequenz, wie sie in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 3 beschrieben ist. Zunächst wurde eine molekulare Epidemiologie-Studie unter mehr als 100 IDUs aus China, die seropositiv bezüglich des Subtyps

10 C von HIV-1 waren, durchgeführt, um notwendige Informationen zu sammeln über repräsentative virale Genome von im wesentlichen voller Länge. Die Genotypisierung auf der Basis der konstanten Region 2 und der variablen Region 3 (C2V3) innerhalb des Gens für das virale Hüll-Glykoprotein offenbarte die höchste Homologie der am meisten prävalenten Virusstämme, die in ganz China zirkulieren, zu Sequenzen des Subtyps C indischen Ursprungs.

15 Basierend auf diesen Ergebnissen wurde aus peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) von einem ausgewählten HIV-infizierten IDU direkt ein Genom von im wesentlichen voller Länge amplifiziert und subkloniert, das die am meisten prävalente Klasse der C-Stämme, die in ganz China zirkulieren, darstellt. Die Sequenzanalyse identifizierte eine Mosaikstruktur, was auf extensive Intersubtyp-Rekombinationsvorgänge zwischen den Genomen der prävalenten C- und

20 (B')-Subtyp-Thai-Virusstämme jener geographischen Region deutet. Eine RIP-Analyse (Recombinand Identification Program Analysis) und phylogenetisches "bootstrapping" legten insgesamt 10 Bruchstellen (i) in der für gagpol kodierenden Region, (ii) in vpr und am 3'-Ende des vpu-Gens und (iii) im offenem Leserahmen von nef nahe. Thai (B')-Sequenzen umfassen daher (i) mehrere Insertionen in der kodierenden Region von gagpol (Nukleotide 478-620, 1290-

25 1830, 2221-2520, jeweils bezogen auf das erste Nukleotid innerhalb des Startkodon des Gag- bzw. des GagPol-Leserahmens), (ii) 3'-vpr, das komplette vpu, die ersten Exons von tat und rev (etwa 1000 Nukleotide beginnend etwa an Nukleotid 138 bezogen auf das Startkodon des Vpr-Leserahmens) und (iii) die 5'-Hälfte des nef-Gens (Nukleotide 1-300). Die übrigen Bereiche innerhalb der 9078 Nukleotide umfassenden Sequenz (SEQ ID NO: 1; Tabelle 3) weisen höchste

30 Homologien zu bekannten Subtyp C Isolaten auf. Bruchstellen von 97cn54, die in der kodierenden Region von vpr/vpu bzw. im nef-Gen lokalisiert sind, wurden bei vielen Stämmen des Subtyps C, die von IDUs isoliert wurden, die in verschiedenen Gebieten Chinas leben, an

ähnlichen Positionen gefunden. Dies legt eine gemeinsame Abstammung für die C/B'-rekombinanten Stämme nahe. Bei mehr als 50% der gut definierten CTL-Epitope, die vom Subtyp B abstammen, innerhalb von Gag und Pol und bei 10% der bekannten Epitope in Env, wurde gefunden, daß die Sequenzen innerhalb dieser C/B'-chimären Referenzstämme exakt
5 übereinstimmen. Diese Ergebnisse können die Anstrengungen in bezug auf Impfstoffe in China deutlich erleichtern, indem außerordentlich wichtige Matrizen für die Konzeption von Impfstoffen bereitgestellt und Reagentien für die am besten geeigneten immunologischen/virologischen Ausleseverfahren entwickelt werden.

10 Die Verwendung der beschriebenen Sequenz gemäß vorliegender Erfindung, einer Sequenz von HIV-1, das den am meisten prävalenten C-Typ Virusstamm innerhalb Chinas darstellt, als Grundlage und Ausgangsmaterial ist für die Entwicklung von präventiv oder therapeutisch einsetzbaren Impfstoffen von Vorteil. Die notwendigen Konsequenzen für die Entwicklung eines erfolgreichen HIV-Impfstoffkandidaten sind (i) ein detailliertes Wissen über die jeweilige
15 epidemiologische Situation und (ii) die Verfügbarkeit einer klonierten kodierenden Sequenz, die innerhalb einer geographischen Region oder einer bestimmten Bevölkerung den am meisten prävalenten Virusstamm repräsentiert. Solche Sequenzen stellen die Grundlage dar (i) für die rationale Konzeption von präventiv und therapeutisch einsetzbaren HIV-Impfstoffkandidaten, (ii) für Entwicklung spezifischer Therapeutika, wie beispielsweise therapeutisch wirksamer Decoy-
20 Oligonukleotiden und Proteine, Antisense-Konstrukte, Ribozyme und transdominant negativ wirksamer Mutanten (iii) für die Entwicklung lentiviraler Vektoren für die Gentherapie und (iv) die Herstellung von Reagenzien, die für Diagnose und Verlaufskontrolle der HIV-Infektion sowie die immunologische/virale Überwachung des Impfungsprozesses eingesetzt werden können.

25 Dies ist insbesondere zutreffend für Impfstoffkandidaten, die auf den HIV-Hüllproteinen beruhen, von denen gezeigt wurde, daß sie unter allen HIV-Proteinen die größte Variabilität aufweisen. Darüber hinaus wird ein erfolgreicher Impfstoff sehr wahrscheinlich beide Arme des Immunsystems induzieren müssen: neutralisierende Antikörper, idealerweise gerichtet gegen
30 Konformations-Epitope im Hüllprotein sowie zellvermittelte Immunantworten (CD4-positive T-Helfer-Zellen, CD8-positive zytolytische T-Zellen, Zytokine vom Typ Th-1, β -Chemokine), erzeugt gegen Epitope verschiedener viraler Proteine. Das Konformations-Epitop gemäß der

- vorliegenden Erfindung besteht aus mindestens 3 Aminosäuren, vorzugsweise aus 5 oder mehr Aminosäuren, die bei der Antikörper-Bindung involviert sind. Konformationelle Epitope können sich auch aus mehreren Abschnitten entweder eines einzigen Proteins, oder - im Falle oligomerer Komplexe wie z.B. des trimeren Hüllglykoprotein-Komplexes - aus mehreren Abschnitten unterschiedlicher Untereinheiten zusammensetzen. Ein lineares Epitop gemäß der vorliegenden Erfindung variiert normalerweise in der Länge und umfaßt mindestens 8 Aminosäuren bis etwa 15 Aminosäuren oder mehr, wobei eine Länge von 9 bis 11 Aminosäuren insbesondere im Falle MHC Klasse I restringierter CTL-Epitope bevorzugt ist.
- 10 Die vorliegende Erfindung betrifft somit ferner Polypeptide, kodiert von der Nukleotidsequenz oder Fragment oder Derivat der Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO:1, 2 oder 3. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Polypeptide, umfassend eine kontinuierliche Sequenz von mindestens 8 Aminosäuren, die von der Nukleotidsequenz oder Fragmenten oder Derivaten der Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO:1, 2 oder 3 kodiert werden. Vorzugsweise umfasst das
- 15 erfindungsgemäße Polypeptid eine antigene Determinante, die natürlicherweise in Infizierten eine Immunreaktion auslöst. Besonders bevorzugt sind Polypeptide, umfassend eine Aminosäuresequenz, kodiert von der Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO:2 oder 3 oder dessen Derivate und Fragmente. Insbesondere bevorzugt sind Epitope umfassend einen kontinuierlichen Bereich von 9 bis 11 Aminosäuren, die identisch sind zwischen den durch SEQ ID NO:1
- 20 kodierten Polypeptiden und einem HIV-1_{LAI} Referenzisolat, oder die 2 oder weniger konservierte Aminosäuresubstitutionen innerhalb der 9 bis 11 Aminosäuren umfassenden Sequenz aufweisen. Beispiele für derartige Epitope sind in Beispiel 11 aufgeführt. Die erfindungsgemäßen Polypeptide können z.B. als Impfstoffe und Therapeutika oder zur Diagnostik verwendet werden.
- 25 Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Polynukleotid gemäß SEQ ID NO:1, 2 oder 3. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein Polynukleotid-Fragment der Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO:1, 2 oder 3, oder ein Polynukleotid, das mindestens eine kontinuierliche Sequenz von Nukleotiden umfaßt, die zur selektiven Hybridisierung an die Nukleotidsequenz, wie sie in SEQ ID NO:1, 2 oder 3 dargestellt ist, in der Lage ist. Ferner
- 30 betrifft die vorliegende Erfindung Derivate der erfindungsgemäßen Polynukleotide oder Polynukleotid-Fragmente. Vorzugsweise umfasst das Polynukleotid oder das Polynukleotid-Fragment eine kontinuierliche Sequenz von mindestens 9 Nukleotiden, bevorzugterweise von

mindestens 15 Nukleotiden, noch bevorzugterweise von mindestens 27 Nukleotiden, oder eine längere Sequenz. Das Polynukleotid oder das Polynukleotid-Fragment kann auch die kodierende Region der einzelnen HIV-Gene umfassen, wie z.B. von gag, pol, env. Beispiele sind in SEQ ID NO: 2 und SEQ ID NO: 3 angegeben. Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft
5 ein Polynukleotid, umfassend mindestens 2 erfindungsgemäße Polynukleotid-Fragmente, wobei die Sequenzen der Polynukleotid-Fragmente auch überlappen oder durch einen Nukleotid-Platzhalter voneinander getrennt sein können. Die Sequenzen der Polynukleotid-Fragmente können identisch oder verschieden sein. Die erfindungsgemäßen Polynukleotide oder Polynukleotid-Fragmente können als Impfstoffe oder Therapeutika oder zur Diagnostik
10 verwendet werden.

Die kodierende Sequenz des Klons 97cn54 und Derivate davon, ausgeführt in Form der SEQ ID NO: 1, als Vertreter des HIV-1 vom Subtyp C kann als Grundlage für die folgenden Anwendungen verwendet werden:

15 Entwicklung von Subtyp-C-spezifischen HIV-1-Impfstoffen für prophylaktische und therapeutische Zwecke. Diese Subtyp-spezifischen Impfstoffe können weltweit in allen geographischen Regionen, wo das Subtyp-C-Virus für die HIV-Epidemie eine wesentliche Rolle spielt, verwendet werden, also z.B. in Lateinamerika, in Afrika und in Asien. Insbesondere
20 sollten HIV-Impfstoffe, die getestet werden sollen in und entwickelt werden sollen für Südost-Asien und China auf der beschriebenen kodierenden Sequenz von 97cn54 beruhen, um Subtyp-spezifische humorale und zellvermittelte Immunantworten zu induzieren. Desweiteren können solche HIV-1 Subtyp C-spezifischen Impfstoffe als eine Komponente in einer Kocktail-Vakzine eingesetzt werden, die entweder alle oder eine definierte Auswahl der weltweit relevanten HIV
25 Subtypen berücksichtigt.

Um gute humorale und zellvermittelte Immunantworten in den Impfungen zu induzieren, enthalten die Antigene oder kodierenden Sequenzen, die dem Immunsystem zugeführt werden sollen, vorzugsweise (i) kurze kontinuierliche Abschnitte von mindestens 3 bis etwa 5
30 Aminosäuren Länge oder längere Abschnitte, abgeleitet von einem der offenen Leserahmen, wie sie in Tabelle 3 abgebildet sind, (ii) Bereiche von vorzugsweise 9 bis 11 Aminosäuren, (iii) Kombinationen dieser Bereiche, die entweder getrennt oder als Polypeptid-Kette (*Epitope*-

Strings) verabreicht werden, wobei die Epitope-Strings bzw. deren Aminosäuresequenzen entweder überlappen oder aber durch Aminosäuren oder andere Platzhalter getrennt sein können, und besonders bevorzugterweise vollständige Proteine oder die entsprechenden kodierenden Sequenzen oder deren Varianten, die auch umfangreiche Deletionen umfassen können. Daher

5 betrifft eine andere Aufgabe der vorliegenden Erfindung Polypeptide, die kodiert werden von den Nukleotidsequenzen oder Fragmenten der Nukleotidsequenzen, wie sie in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 und SEQ ID NO: 3 dargestellt sind. Vorzugsweise umfaßt das Polypeptid eine kontinuierliche Sequenz von mindestens 8 Aminosäuren, vorzugsweise mindestens von 9 bis 11 Aminosäuren, besonders bevorzugterweise von mindestens 15 Aminosäuren oder längere

10 Sequenzen oder diskontinuierliche Epitope, die sich vorzugsweise aus wenigstens drei Aminosäuren einer einzigen Polypeptidkette oder, im Falle oligomerer Proteinkomplexe, auch unterschiedlicher Polypeptidketten zusammensetzen. Impfstoff-Konstrukte auf der Basis der kodierenden Sequenz von 97cn54 schließen alle im Stand der Technik bekannten Antigenformen ein und greifen auf einschlägige Verabreichungssysteme zurück.

15

Kurze Epitope, kodiert von Fragmenten der Nukleinsäuresequenzen gemäß SEQ ID NO: 1 bis 3, und jeweils drei bis fünf Aminosäuren, vorzugsweise von 9 bis 11 oder mehr Aminosäuren umfassend, können vorzugsweise synthetisch hergestellt werden. Derartige Peptide enthalten entweder ein B-Zellepitop, ein MHC Klasse II-restringiertes T-Helferepitop, ein MHC Klasse I-restringiertes zytotoxisches T-Zellepitop oder Kombinationen der genannten Varianten. Dabei

20 können einzelne Epitope überlappen oder auch durch Platzhalter, präferentiell bestehend aus Glyzin und/oder Serin Resten voneinander getrennt sein. Verzweigtkettige Peptide können entsprechend dem Stand der Technik entweder während der Synthese oder unter Zuhilfenahme der gängigen und kommerziell erhältlichen homo- und heterobifunktionellen chemischen

25 Quervernetzer im Anschluß an die Synthese und Reinigung der entsprechenden Peptide erzeugt werden. Alternativ können *per se* wenig immunogene Peptide durch Quervernetzung auch an ausgewählte Trägerproteine wie z.B. Ovalbumin konjugiert werden, gentechnisch in Trägerproteine inseriert oder an deren N- bzw. C-Terminus fusioniert werden. Vorzugsweise sind derartige Trägerproteine (i) bei Expression in geeigneten Zellkultursystemen (siehe unten) oder

30 (ii) nach geeigneter Rückfaltung des gereinigten, denaturierten Proteins in der Lage, partikuläre Strukturen auszubilden, bei denen B-Zellepitope vorzugsweise auf der Oberfläche des partikulären Carriers zu liegen kommen. Zahlreiche Beispiele solcher zur Ausbildung

- partikulärer Strukturen tendierender Polypeptide sind mittlerweile bekannt wie beispielsweise das Hepatitis B-Virus (HBV) Core Antigen (HBcAg), das HBV Oberflächenprotein (HBsAg), das HIV gruppenspezifische Antigen, das Polyomavirus VP1 Protein, das Pappillomvirus L1 Protein oder das TyA Protein der Hefe. Aufgrund der Tatsache, daß sich die Mehrheit der bislang
- 5 beschriebenen partikelbildenden Proteine aus den Kapsid- oder Strukturproteinen unterschiedlichster Viren rekrutiert, spricht man hier auch von Virus-ähnlichen Partikeln (VLP, virus-like particles; Übersicht: Sonderausgabe *Vaccine*. (1999) Volume 18. *Advances in Peptide, Protein and Nucleic Acid Vaccine Strategies*. edited by Prof. P.T.P. Kauyama)
- 10 *Epitop-Strings* und Polypeptide, kodiert von Fragmenten der Nukleinsäuresequenzen gemäß SEQ ID NO: 1 bis 3, mit einer Länge größer 30, vorzugsweise größer 50 Aminosäuren sowie Polypeptide mit einer Tendenz zur Ausbildung partikulärer Strukturen (VLP) können nach dem Stand der Technik in Prokaryonten produziert und gereinigt werden. Derartige Plasmide enthalten dementsprechend einen bakteriellen Replikationsursprung wie z.B. ColE1, in aller
- 15 Regel einen Selektionsmarker wie z.B. eine Resistenz gegenüber Kanamycin oder Ampizillin, eine konstitutiv aktive oder induzierbare Transkriptions-Kontrolleinheit wie beispielsweise den LacZ- oder Tac Promotor, sowie die Signale zum Translationsstart und Translationsstop. Zur vereinfachten Expression und Affinitätsreinigung können auch optional abspaltbare Fusionsanteile und Reinigungshilfen wie beispielsweise die Glutathion-S-Transferase oder
- 20 Reinigungshilfen wie z.B. Oligohistidin-tags (Fänger) verwendet werden.

- Die DNA- oder RNA-Sequenzen, die (i) zur Herstellung der *Epitop-Strings*, kompletter Proteine oder Virus-ähnlicher Strukturen in eukaryontischen Zellkulturen wie z.B. Hefezellen, Pilzen, Insektenzellen oder Säugerzellen verwendet werden oder die (ii) zur direkten Verabreichung von
- 25 DNA zu Immunisierungszwecken eingesetzt werden, können sich auf eine Verwendung der Kodons verlassen, wie sie vom Virus selbst verwendet wird. Alternativ kann die Verwendung der Kodons, wo immer technisch möglich, angepasst werden an die am häufigsten oder zweithäufigsten verwendeten Kodons in Genen, die im jeweiligen Produktionssystem hoch exprimiert werden. Beispiele für die Optimierung des Kodongebrauchs in einem unter
- 30 Sicherheitsaspekten optimierten Polygen, beinhaltend die Gene Gag, Pol und Nef, sowie im Hüllprotein-Gen sind gegeben in SEQ ID NO: 2 und SEQ ID NO: 3. Die SEQ IDs NO: 2 und 3 sind in Beispiel 15 näher spezifiziert.

Die Etablierung von Zelllinien zur Produktion der *Epitop-Strings*, Polypeptide oder Virus-ähnlichen Strukturen in den genannten Zellkultur-Systemen kann dem Stand der Technik entsprechend auf Vektoren basieren, die wiederum neben einem bakteriellen
5 Replikationsursprung, einem positiven oder negativen Selektionsmarker vor allem die entsprechenden Kontrollregionen zur regelkonformen Transkription und Translation des Fremdproteins beinhalten können. Die nachfolgend beschriebenen Komponenten der DNA Vakzinkonstrukte stehen exemplarisch auch für die Module, die sich auch in Vektoren zur Expression der *Epitop-Strings*, Polypeptide oder kompletten Proteine in unterschiedlichen
10 Säugerzellkulturen wiederfinden.

Bei der einfachsten Form der Immunisierung handelt es sich um die direkte Verabreichung eines reinen DNA-Impfstoffes. Dieser enthält im wesentlichen 5'-seitig vom kodierenden Bereich eine Transkriptions-Kontrollregion, auch Promotor/Enhancer-Region genannt, der wahlweise ein
15 funktionelles Intron zur Steigerung der Genexpression folgen kann, (ii) eine Kozak-Sequenz inklusive eines Translations-Startkodons sowie am 3'-Ende des Fremdgens ein Translations-Terminationskodon gefolgt von einer Polyadenylierungs-Signalsequenz. Die Promotor/Enhancerregion kann präferentiell eine konstitutive Expression des gewünschten Genproduktes unterstützen und ist beispielsweise von der Transkriptions-Kontrollregion eines
20 unmittelbar frühen (IE) Cytomegalievirus-Gens (CMV-IE) oder dem Rous-Sarcoma Virus (RSV) LTR (*long terminal repeat*) abgeleitet. Alternativ kann auch eine induzierbare Form einer Transkriptions-Kontrollregion wie z.B. ein *Tet on/Tet off* Promotor verwendet werden, bei dem die Transkription beispielsweise durch die Gabe von Tetrazyklin oder entsprechender Analoga reguliert wird. Desweiteren bietet sich hier die Verwendung von Zelltyp-spezifisch regulierten
25 Transkriptions-Kontrollregionen an wie z.B. die stromaufwärts des Muskel-Kreatin-Kinase Gens (MCK Gen; muskelspezifische Expression), des CD4-Rezeptorgens oder der MHC Klasse II Gene (präferentielle Expression in Antigen-präsentierenden Zellen) gelegenen Promotor/Enhancerregionen. In einigen Fällen verwendet man auch chimäre Kombinationen aus
(i) Zelltyp-spezifischen Promotoren und (ii) viralen Enhancerregionen, um die Vorteile einer
30 gewebespezifischen Expression mit denen der starken Transkriptionsaktivität viraler Enhancer zu vereinen. Die Verstärkung der Genexpression durch das Einbinden eines in aller Regel 5'-seitig des offenen Leserahmens gelegenen funktionellen Introns geht auf eine gesteigerte

Kernexportrate gespleißter im Vergleich zu ungespleißten Transkripten zurück und wird beispielsweise durch die Insertion eines im β -Globin Gen gelegenen Introns erreicht.

5 Eine bevorzugte Form eines auf SEQ ID NO:1, 2 oder 3 basierenden DNA-Impfstoffs enthält zusätzlich ein von Alpha-Viren wie beispielsweise von Semliki-Forest- oder Venezuela-Encephalitis-Viren (SFV, VEE) abgeleitetes Replikon. In diesem Fall folgt der oben beschriebenen nukleären Transkriptions-Kontrolleinheit und dem wahlweise berücksichtigten Intron zunächst der für die VEE oder SFV Nichtstrukturproteine (NS) kodierende Bereich. Erst 3' seitig davon folgt das eigentliche Fremdgen, dessen zytoplasmatische Transkription seinerseits 10 durch einen NS-sensitiven Promotor reguliert wird. Dementsprechend wird ausgehend von der nukleären Transkriptions-Kontrolleinheit ein langes Transkript über mehrere offene Leserahmen erzeugt, das anschließend ins Zytoplasma transloziert wird. Die dort synthetisierten NS-Proteine aktivieren dann durch Bindung an die entsprechende Kontrollregion die zytoplasmatische Transkription der Fremdgene. Dieser Amplifikationseffekt führt in aller Regel zu einer 15 abundanten RNA Synthese und folglich hohen Fremdprotein-Syntheseraten. Letzteres erlaubt, im direkten Vergleich mit konventionellen Plasmiden, die auf den beschriebenen Effekt durch zytoplasmatische RNA Amplifikation verzichten, in aller Regel eine deutliche Reduktion der zu verabreichenden Plasmidmenge bei wenigstens vergleichbarer Immunogenität.

20 Die oben beschriebenen Peptide, Proteine, Virus-ähnlichen Partikel und DNA-Konstrukte können durch intramuskuläre, subkutane, intradermale, intravenöse Injektion verabreicht werden, wobei für die Verabreichung der proteinösen Antigene jeweils der Stand der Technik angewendet wird. Zur DNA-Immunisierung können entweder konventionelle Spritzen mit Injektionsnadeln verwendet werden, oder aber Gerätschaften, die ohne Nadeln auskommen und in aller Regel die 25 DNA über Druckluft direkt in das gewünschte Gewebe einbringen können. Dazu zählt insbesondere auch die intranasale und orale Applikation DNA-haltiger Vakzin-Formulierungen durch sprayartige Vorrichtungen. Alternativ dazu kann die DNA auch an feste Träger wie z.B. Goldkügelchen konjugiert und beispielsweise unter Luftdruck in die entsprechenden Gewebe verabreicht werden.

30

Zur Verstärkung oder Modulation der Immunantwort können die erwähnten proteinösen Antigene und DNA-Konstrukte auch mit sogenannten Adjuvantien, i.d. Regel Stimulatoren der

Immunantwort, kombiniert oder in einer sequentiellen Abfolge mit den Adjuvantien verabreicht werden. Konventionelle Adjuvantien wie z.B. Aluminiumhydroxyd oder Aluminium-Hydroxyphosphat resultieren in einer Stimulation der humoralen Immunantwort, die sich auch durch hohe Antikörpertiter vom IgG1 Subtyp auszeichnet. Modernere Adjuvantien, wie
5 beispielsweise CpG Oligonukleotide (Konsensuskernmotiv: Purin-Purin-CpG-Pyrimidin-Pyrimidin) oder chemisch modifizierte Derivate davon (Phosphothioat-Oligonukleotide; Oligonukleotide mit Peptidrückgrat) verstärken üblicherweise den zellulären Arm der Immunantwort und unterstützen vornehmlich den Th1-Typ der zellvermittelten Immunität, gekennzeichnet durch hohe Antikörpertiter vom Subtyp IgG2a und die Induktion von Th1
10 Zytokinen wie z.B. γ -IFN, IL-2 und IL-12.

Die Verabreichung und Aufnahme von Peptiden, Proteinen und DNA-Vakzinkonstrukten kann insbesondere auch verbessert werden durch Bindung an oder Inkorporation in höhermolekulare Strukturen, wie z.B. biodegradierbare Partikel, multilamellare, idealerweise kationische
15 Liposomen, immunstimulierende Komplexe (ISCOMS), Virosomen oder *in vitro* assemblierter Viruspartikel. Zu biodegradierbaren Partikeln zählen beispielsweise PLA- (L-lactic acid), PGA- (polyglycolic) oder PLGA- [poly (D,L-lactide-co-glycolide)] Mikrosphären oder Derivate davon, kationische Mikropartikel oder von bakteriellen Kapselpolysacchariden abgeleitete Trägersubstanzen. Der Sammelbegriff ISCOMS steht für immunstimulierende Komplexe, die auf
20 wasserlöslichen Extrakten der Rinde von *Quillaja saponaria* entstammen und mittels chromatographischer Verfahren weiter aufgereinigt wurden. Eine dem Stand der Technik entsprechende, detaillierte Übersicht zu den unterschiedlichsten Adjuvantien und Verabreichungshilfen findet sich unter
<http://www.niaid.nih.gov/aidsvaccine/pdf/compendium.pdf> [Vogel, F. R., Powell, M. F. and
25 Alving, C. R. „A Compendium of Vaccine Adjuvants and Excipients (2nd Edition)].

Desweiteren können zur günstigen Präsentation von Epitop-Strings, Polypeptiden und Virus-ähnlichen Partikeln virale und, alternativ, bakterielle Vektoren eingesetzt werden.

30 Nach dem aktuellen Stand der Technik eignen sich beispielsweise gentechnisch veränderte Salmonellen und Listerien aufgrund ihres natürlichen Zelltropismus in besonderer Weise dazu, DNA-Vakzinkonstrukte in Antigen-präsentierende Zellen wie Monozyten, Makrophagen und

vor allem in dendritische Zellen einzubringen. Die gentechnischen Veränderungen können neben einem Gewinn an Zelltypspezifität unter anderem dazu beitragen, daß die DNA unbeschadet das Zytoplasma der Antigen-präsentierenden Zelle erreicht. In diesem Fall gelangt ein DNA-Vakzinkonstrukt in den Zellkern, wo über einen eukaryontischen, vorzugsweise viralen oder zelltypspezifischen Promotor der entsprechende Leserahmen unter Nutzung der zellulären Ressourcen und Proteine transkribiert wird. Nach dem Transport der RNA ins Zytoplasma wird das entsprechende Genprodukt translatiert und, je nach Beschaffenheit, posttranslational modifiziert und dem entsprechenden zellulären Kompartiment zugewiesen.

- 5
10 Bakterielle Vektoren (Salmonellen, Listerien, Yersinien etc.) können auch zur Induktion einer Schleimhautimmunität, vorzugsweise nach oraler Verabreichung verwendet werden. Dabei werden die entsprechenden Antigene durch die bakterielle Transkriptions- und Translationsmaschinerie hergestellt und unterliegen demnach nicht den in Säugerzellen sonst üblichen posttranslationalen Modifikationen (keine entsprechende Glykosylierung; kein sekretorischer *Pathway*).

- Daneben existieren mittlerweile eine Vielzahl von attenuierten viralen Vektoren, mit deren Hilfe sich die gewünschten Antigene erfolgreich und in hohen Ausbeuten exprimieren lassen. Neben deren Tauglichkeit zur reinen Antigen-Produktion können solche virale Vektoren auch direkt zur Immunisierung eingesetzt werden. Diese kann zunächst entweder *ex vivo* erfolgen, beispielsweise zur Infektion von Antigen-präsentierenden Zellen, die anschließend dem Impfling verabreicht werden, oder direkt *in vivo* durch die subkutane, intradermale, intracutane, intramuskuläre oder intranasale Immunisierung mit dem rekombinanten Virus, die eine günstige Antigen-Präsentation mit entsprechendem Immunisierungserfolg erzielen läßt. So können beispielsweise durch Immunisierung mit rekombinanten Vakzinia Viren wie z.B. dem durch Passagieren über Hühnerzellen attenuierten *Modifizierten Vaccinia Virus Ancara* (MVA), dem gentechnisch attenuierten Vaccinia Stamm *New York* (NYVAC) oder die in Vögeln endemischen aviären Vaccinia Viren (*Fowlpox*, *Canarypox*) adäquate humorale und zellvermittelte Immunantworten in den geimpften Personen induziert werden. Alternativ eignen sich dazu in gleicher Weise auch eine Reihe anderer Viren wie z.B. rekombinante Alpha-Viren, darunter das Semliki-Forest Virus oder das Venezuela-Enzephalitis Virus, rekombinante Adenoviren, rekombinante Herpes Simplex Viren, Influenzaviren und andere.
- 20
25
30

Letztlich können auf Basis der SEQ ID NO:1, 2, oder 3 auch attenuierte HIV-Viren generiert und zu Immunisierungszwecken eingesetzt werden, sofern mittels Kloniervverfahren nach dem Stand der Technik die Regulationssequenzen (LTR, long terminal repeat), die den kodierenden Bereich flankieren, ergänzt werden. Eine hinreichende Attenuierung des Virus kann dann entsprechend dem Stand der Technik durch eine oder mehrere Deletionen beispielsweise im Nef-Gen erzielt werden

Die in den Beispielen SEQ ID NO: 1 und SEQ ID NO: 3 ausgeführten Nukleinsäuresequenzen sowie daraus abgeleitete Peptide, Proteine oder Virus-ähnlichen Partikel können auch als Komponenten viraler Vektoren zur Genüberführung eingesetzt werden.

Die durch das GagPol-Gen (SEQ ID NO:1; Nukleotid 177-4458; Tabelle 3) kodierten Polypeptide können beispielsweise die Verpackungs- und Rezeptorfunktionen von z.B. lenti- oder retroviralen Vektoren bereitstellen. So können z.B. nach transienter Transfektion von Säugerzellen durch geeignete Plasmidvektoren, welche die gleichzeitige Expression des GagPol und VSV-G (vesicular stomatitis virus Hüllprotein G) Gens unterstützen und die Verpackung eines therapeutischen Transgens sicherstellen, Viruspartikel erzeugt werden, die auch in der Lage sind, ruhende, postmitotische oder enddifferenzierte Zellen zu transduzieren. Dieses Verfahren zur Generierung transduktionskompetenter Viruspartikel kann wesentlich erleichtert und effizienter gestaltet werden, beispielsweise durch die Etablierung stabiler Zelllinien, z.B. basierend auf *human embryonic kidney* Zellen (HEK293), die das GagPol Polyprotein konstitutiv oder unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors exprimieren. Alternativ können auch rekombinante Adenoviren generiert werden, die die Verpackungsfunktionen, die Rezeptorfunktionen und die Transgenfunktionen oder Kombinationen daraus kodieren, und so als Werkzeug zum *ex vivo*, *in situ* und *in vivo* Delivery von retro- oder lentiviralen Vektoren dienen.

Die durch SEQ ID NO: 3 kodierten Hüllproteine oder Derivate davon können die Rezeptorfunktion für lenti-, spuma- oder retrovirale Vektoren oder anderer, auf umhüllten Viren basierender Vektoren durch Inkorporation in den Lipid-Bilayer bereitstellen. Dazu können beispielsweise auch Verpackungslinien erzeugt werden, bei denen sowohl die GagPol Proteine von Retro-, Spuma- und vorzugsweise von Lentiviren, als auch die aus SEQ ID NO: 1 und 3

abgeleiteten Hüllproteine entweder konstitutiv oder unter Kontrolle eines induzierbaren, wahlweise eines in der Aktivität regulierbaren Promotors exprimiert werden. Alternativ dazu können, beispielsweise basierend auf dem Genom von Typ C oder Typ D Retroviren oder anderer membranumhüllter Viren wie z.B. Influenza- oder Herpesviren, chimäre Viren generiert
5 werden, die zusätzlich zu dem natürlichen Hüllprotein oder anstelle des natürlichen Hüllproteins ein von SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 abgeleitetes Hüllprotein auf der Oberfläche tragen.

Gegen die aus den SEQ IDs NO: 1 bis 3 abgeleiteten Peptide, Proteine oder Virus-ähnlichen Partikel können auch (i) polyklonale Antiseren, (ii) monoklonale Antikörper (Maus, Mensch,
10 Kamel), (iii) Antikörperderivate wie beispielsweise *single-chain* Antikörper, humanisierte Antikörper, bispezifische Antikörper, Phagen-Antikörperbanken oder (iv) andere hochaffin bindende Polypeptide wie z.B. Derivate des hPSTI (human pancreatic secretory trypsin inhibitor) generiert werden. Diese Reagentien können zu therapeutischen Zwecken, beispielsweise zur Behandlung von HIV-Infektionen oder zu diagnostischen Zwecken, beispielsweise zur
15 Herstellung von Testkits verwendet werden.

Auf ähnliche Weise können die aus SEQ ID NO:1, 2 oder 3 abgeleiteten Peptide, Proteine oder Nukleinsäure-Sequenzen für diagnostische Zwecke, z.B. für die Serodiagnostik und für die Anwendung von Nukleinsäure-Hybridisierungstechniken oder Nukleinsäure-
20 Amplifikationssystemen oder Kombinationen davon verwendet werden. Vorzugsweise können die erfindungsgemäßen Polynukleotid-Fragmente der Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO:1 in einer Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt werden. Besonders bevorzugt werden die erfindungsgemäßen Polynukleotid-Fragmente der Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO:1 zur Diagnostik mittels DNA-Chiptechnologie eingesetzt.

25

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

Beispiel 1:

30 Blutproben

Alle Blutproben, die für diese Studie verwendet wurden, wurden im Zuge der nationalen, molekularepidemiologischen Studie von 1996/1997 bezüglich HIV-1, Subtyp C, seropositiven

IDUs aus mehreren HIV-epidemischen Gebieten in China entnommen. Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) wurden mittels Ficoll-Gradienten abgetrennt. Die Viren wurden durch Kokultivierung der PBMCs von seropositiven IDUs mit Phytohämagglutinin (PHA)-stimulierten Donor-PBMCs isoliert. Positive Viruskulturen wurden aus den Zellkultur-Überständen
5 nachgewiesen mittels des HIV-1 p24 Core Profile ELISA-Kits (DuPont Inc., Boston, MA).

Beispiel 2:**Polymerase Kettenreaktionen (PCR) und DNA-Sequenzierung**

Provirale DNA wurde aus produktiv infizierten PBMCs von mehr als einhundert ausgewählten
10 HIV-1-positiven IDUs aus den nordwestlichen Provinzen Chinas extrahiert (Qiagen Inc., Valencia, CA). Die *Nested*-PCR wurde verwendet, um die kodierende Region für env C2V3 zu amplifizieren. Die PCR-Produkte wurden mittels der *Taq-cycle*-Methode unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Terminatoren (Applied Biosystems, 373A, Foster City, CA) wie kürzlich beschrieben (Bai et al. 1997; Yu et al. 1997) direkt sequenziert. Multiple
15 Sequenzvergleiche wurden unter Verwendung der *Wisconsin software package Genetics Computer Group* mit den Korrekturmethode nach Kimura durchgeführt (GCG, 1997, Version 9).

Beispiel 3:

20 Phylogenetische Stammbaum-Analysen wurden von allen erhaltenen Sequenzen unter Verwendung des PHYLIP-Software-Pakets durchgeführt. Evolutionäre Entfernungen wurden an Hand der *maximum parsimony*-Methode berechnet und durch kumulative horizontale Länge der Zweige angegeben. Die statistische Robustheit des *neighbour joining* Stammbaums wurde wie kürzlich beschrieben durch *bootstrap resampling* überprüft (Graf et al. 1998).

25

Beispiel 4:**Auswahl eines repräsentativen HIV-1-Isolats des Subtyps C von chinesischen IDUs**

Innerhalb der Gruppen betrugen die berechneten durchschnittlichen Abstände innerhalb der für C2V3 kodierenden Region auf DNA-Ebene $2,26 \pm 1,43$, was darauf hindeutet, daß die Epidemie
30 in diesem Gebiet noch sehr jung ist. Die Unterschiede zwischen den Gruppen zwischen chinesischen Subtyp-C-Sequenzen und denen aus Indien, Afrika, und Südamerika betrugen $9,67 \pm 2,31$ (Indien), $15,02 \pm 4,13$ (Afrika) und $8,78 \pm 3,41$ (Südamerika). Das zeigt eine enge

phylogenetische Verwandtschaft zwischen indischen und chinesischen Subtyp-C-Sequenzen (Lole et. al. 1999) und eine nennenswerte genetische Entfernung zu der *per se* relativ heterogenen Gruppe afrikanischer HIV-1-Stämme des Subtyps C.

5 **Beispiel 5:**

Identifizierung eines Virus-Isolats, das den in China zirkulierenden prävalenten Virus-Stamm des Subtyps C am besten repräsentiert

- Aus den analysierten Proben wurde ein als 97cn54 bezeichnetes repräsentatives Isolat identifiziert, das höchste Homologie (99,6%) zu einer berechneten Konsensus-Sequenz (cn-conV3), die auf Grundlage der charakterisierten lokalen HIV-Sequenzen (Tabelle 1) erstellt worden ist, aufweist. Multiple Aminosäure-Sequenzvergleiche einschließlich der Primärsequenzen der V3-Schleife von primären Subtyp-C-Vertretern aus den verschiedensten epidemischen Regionen und auch Konsensus-Sequenzen von anderen Subtypen (A-H, O, CPZ) unterstrichen den Subtyp-C-Charakter des ausgewählten Primärisolats 97cn54 (Tabelle 1).
- 10 Verglichen mit einer V3-Gesamtkonsensus-Sequenz (consensus) zeigen sowohl 97cn54 als auch cn-con-c Aminosäure-Abweichungen an den Positionen 13 (H→R) und 19 (A→T), die beide charakteristisch für Isolate des Subtyps C sind (C_consensus).
- 15

20

25

30

Tabelle 1: Aminosäure-Sequenz-Vergleich der V3-Schleifen:

	Position	1	11	21	31	38
	Consensus	CTRPNNNTRK	SIHIGPGQAF	YA---TGDII	GDIRQAHC	
5	C_94IN11246	-----	--r----t-	--	--e-v	-n-----
	C_93IN905	-----	--r----t-	--	---m	-----
	C_93IN999	-vr-----e	--r----t-	--	--e-	-----
	C_consensus	-----	--r----t-	----	-----
10	C_ind8	-----	-tr----t-	----	-----
	97cn54-v3	---g-----	--r----t-	----	-----
	cn-con-v3	---g-----	--r----t-	----	-----
	C_bro025	-----	--r------e-	----	-----
15	C_ind1024	-----	--r----t-	----	---r-y-
	C_nof	-----	r-rv---tv-na-	----	-----
	C_zam20	-a--g-----	--r----t-	f-....-a-	----	-----
	C_sml45	---ya-----	-vr----t--n-	----	-----
	A_consensus	-----	-vr-----	----	-----
20	B_consensus	-----	-----r-	-t...-e-	----	-----
	D_consensus	---y---q	rt-----l-tr-	----	-----
	E_consensus	---s---t	-t-----v-	-r...----	----	---k-y-
	F_consensus	-----	-l-----	----	---k---
	G_consensus	-----	-t-----	----	-----
25	H_consensus	-----	-s-----	----	---k-y-
	O_consensus	-e--gidige	..r---m-w	-smglg-tng	nss-a-y-	

Tabelle 1: Der Aminosäure-Sequenz-Vergleich der V3-Schleifen von Konsensus-Sequenzen verschiedener Subtypen von HIV-1 (A-O) und ausgewählte Isolate des Subtyps C aus verschiedenen Ländern. Die V3-Gesamtkonsensus-Sequenz wurde durch den Vergleich der

30 **Konsensus-Sequenzen von verschiedenen Subtypen (A-O) ermittelt. cn-con-V3 stellt die Konsensus-Sequenz von HIV-1-Stämmen Subtyps C, die in China prävalent sind, dar. 97cn54 wurde als repräsentatives Standard-Isolat der in China vorkommenden prävalenten HIV-1-Stämme des Subtyps C ausgewählt. "-" bedeutet keinen Austausch gegenüber der V3-Konsensus-**

35 **Sequenz, Kleinbuchstaben bedeuten eine Aminosäure-Substitution und "." bedeutet Lücken. Alle Konsensus- und Isolat-Sequenzen für multiple Vergleiche wurden von der Datenbank Los Alamos erhalten.**

Beispiel 6:

40 **Die für das 97cn54 Hüllprotein kodierende Sequenz ist am nächsten verwandt mit Virus-Stämmen des Typs C aus Indien.**

Phylogenetische Stammbaum-Analysen, ursprünglich basierend auf den C2V3-Sequenzen des

env-Gens, ergaben, daß sowohl 97cn54 als auch die Konsensus-Sequenz der chinesischen Isolate des Subtyps C sich mit den Stämmen des Subtyps C aus Indien (ind8, d1024, c-93in905, c-93in999, c-93in11246), aus Afrika (c-eth2220, c-ug286a2), und aus Südamerika (92br025, nof, cam20 und sm145) gruppieren (clustern). Dies weist darauf hin, daß die indischen Virus-Stämme des Subtyps C der Ursprung der Epidemie von HIV-1, Subtyp C, in China sein könnten (Figur 1). Diese Hypothese stimmt auch überein mit unserer früheren epidemiologischen Erkenntnis, die bestätigt, daß mit HIV-1, Subtyp C, infizierte Menschen in Yunnan Injektionskanülen mit indischen Schmuckhändlern im Grenzgebiet geteilt haben sollen (Shao et al. 1999).

10 Beispiel 7:

Klonierung des HIV-1-Genoms von im wesentlichen voller Länge

Genome von HIV-1 von im wesentlichen voller Länge wurden amplifiziert mittels des *Expand Long Template PCR*-Systems (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Deutschland), wie beschrieben bei Graf et al. (1998) und Salminen et al. (1995). Die Startermoleküle (Primer) wurden in konservierten Regionen innerhalb der langen terminalen Wiederholungen (LTR) von HIV-1 positioniert: TBS-A1 (5'-ATC TCT AGC AGT GGC GGC CGA A) und NP-6 (5'-GCA CTC AAG GCA AGC TTT ATT G). Gereinigte PCR-Fragmente wurden mit glatten Enden in einen mit *SrfI* verdauten pCR-Script-Vektor (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) ligiert und in den *E. coli*-Stamm DH5 α transformiert. Verschiedene rekombinante Klone, die im wesentlichen das HIV-1-Genom voller Länge enthielten, wurden mittels Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP) und Sequenzierung der kodierenden Sequenz der V3-Schleife identifiziert. Laut RFLP-Analyse unter Verwendung verschiedener Kombinationen von Restriktionsendonukleasen und nachfolgender Sequenzierung der kodierenden Sequenz der V3-Schleife waren 77% der positiven Konstrukte voller Länge nahezu identisch. Ein Provirus-Konstrukt, das die breite Mehrheit der positiven Klone repräsentiert, wurde ausgewählt und wie oben beschrieben unter Verwendung des *primer-walking*-Ansatzes sequenziert (die Startermoleküle wurden ungefähr alle 300 bp entlang des Genoms für beide Stränge entworfen).

Beispiel 8:

30 DNA-Sequenzen wurden unter Verwendung der Lasergene Software (DNASTAR, Inc., Madison, WI) auf Macintosh-Computern zusammengesetzt. Alle Referenzsequenzen der Subtypen dieser Studie sind von der Los Alamos HIV Datenbank. Ähnlichkeiten in der Nukleotid-Sequenz

wurden mittels des lokalen Homologie-Algorithmus von Smith und Waterman berechnet. Multiple Sequenzvergleiche mit verfügbaren Sequenzdaten anderer Subtypen wurden unter Verwendung des Wisconsin Softwarepakets *Genetics Computer Group* (GCG, 1997, Version 9) durchgeführt.

5

Beispiel 9:

Gesamtstruktur der kodierenden Sequenz von 97cn54

Die 9078 bp lange genomische Sequenz des Isolats 97cn54 enthielt alle bekannten strukturellen und regulatorischen Gene des HIV-1-Genoms. Es wurden keine wesentlichen Deletionen, Insertionen oder Umlagerungen gefunden. Die Ähnlichkeiten in der Nukleotid-Sequenz wurden untersucht mittels Vergleich aller kodierenden Sequenzen (CDS) von 97cn54 mit Konsensus-Sequenzen verschiedener Genotypen und ausgewählter Subtyp-Isolate (Tabelle 2). Die höchsten Homologien der Leserahmen von gag, pol, env und vif zu den entsprechenden Konsensus-Sequenzen des Subtyps C lagen in einem Bereich von 93,93 bis 95,06%. Diese Beobachtung erweiterte den oben beschriebenen Sequenzvergleich und die phylogenetische Stammbaum-Analyse aufgrund von C2V3 erheblich (siehe Tabelle 1 und Figur 1). Sie bestätigte daher eindeutig, daß das ausgewählte Virus-Isolat zur Gruppe der kürzlich veröffentlichten Virus-Stämme des Subtyps C gehört. Die durch diese Art der Analyse für die Gene tat, vpu, vpr und nef bestimmten Werte der Homologie waren jedoch nicht ausreichend, um eine klare Zuordnung dieser Leserahmen zu Virus-Stämmen des Subtyps B oder C zu erlauben (Tabelle 2). Für das Gen vpu wurden die höchsten Homologien zu den Subtypen B registriert (94,24%), während die Homologie zu der Konsensus-Sequenz des Subtyps C nur 78,23% betrug. Ähnliche Beobachtungen wurden für das Gen tat gemacht: höchste Homologie zum Isolat B'-rl42 (>91%), im Vergleich zu 87,9% (C-92br025) und 85,5% (C-eth2220) für ausgewählte primäre Vertreter des Subtyps C oder 89,01% für die Konsensus-Sequenz des Subtyps C. Diese Daten legten zusammen mit dem Auftreten der Genotypen B, C und E im ganzen epidemischen Gebiet von Yunnan nahe, daß das analysierte Virus-Isolat einen Mosaik-Virusstamm darstellen könnte, der die Folge eines Rekombinationsvorgangs zwischen Subtyp B' und Subtyp C ist.

30

Tabelle 2: Vergleich der kodierenden Sequenzen von 97cn54 mit den entsprechenden Genen von Referenz-Stämmen und Subtyp-spezifischen Konsensus-Sequenzen.

Prozent Identität mit 97cn54									
CDS	gag	pol	vif	vpr	tat	rev	vpu	env	nef
A	87.68	91.80	86.81	83.66	84.90	83.97	79.82	85.75	84.19
B	90.43	91.93	88.04	90.31	86.56	82.08	94.24	84.52	88.13
B-mn	89.38	90.82	86.01	89.31	87.44	79.48	88.21	82.33	85.41
B'-rl42	91.53	90.76	86.01	88.97	91.163	80.23	96.74	82.70	85.99
C	94.65	94.29	95.06	91.39	89.01	91.99	78.23	93.93	88.82
C-92br025	92.19	92.91	88.51	90.03	87.91	89.70	76.13	88.51	86.20
C-eth2220	91.4	92.06	87.15	90.77	85.57	88.08	80.09	87.15	87.08
D	89.80	91.08	87.74	87.94	83.93	84.39	87.30	85.26	86.88
E/A	86.324	89.07	86.59	83.39	81.44	81.74	77.31	82.09	84.18
F	88.02	88.99	86.36	86.25	80.65	86.25	82.33	84.02	/
G	88.08	/	/	/	/	/	/	84.55	/
H	87.69	89.45	86.01	85.22	/	/	/	83.74	/
O	73.42	78.02	72.12	76.604	72.31	76.60	59.54	67.01	80.35
CPZ	74.14	78.80	93.75	75.44	76.00	75.44	64.41	72.42	/

- 5 **Tabelle 2: Nukleotidsequenz-Vergleich aller kodierenden Sequenzen (CDS) zwischen 97cn54 und DNA-Sequenzen, die entweder (1) Konsensus-Sequenzen bestimmter HIV-1-Subtypen (erhalten von der Los Alamos HIV-Datenbank) oder (2) Isolate des Standard-Subtyps C (92br025 und eth2220) und B (mn und rl42) darstellen. Die Daten geben die Identität einer bestimmten Sequenz mit 97cn54 in Prozent an. Nicht-eindeutige Nukleotid-Positionen innerhalb der**
- 10 **Konsensus-Sequenzen wurden als identisch bewertet. Die höchsten Homologien sind in Fettdruck hervorgehoben. "/" bedeutet, daß von der Los Alamos Datenbank keine Konsensus-Sequenz verfügbar war.**

Beispiel 10:

- 15 **Bestimmung der Rekombinationen zwischen den Subtypen**

Das rekombinante Identifikationsprogramm (RIP, Version 1.3; <http://hiv-wew.lanl.gov/tools>) wurde verwendet, um potentielle Mosaik-Strukturen innerhalb der Gesamtsequenz dieses Klon zu identifizieren (Fenstergröße: 200; Schwellenwert für die statistische Signifikanz: 90%; Umgang mit Lücken: STRIP; informativer Modus: OFF). Es wurden Lücken eingeführt, um den

Vergleich zu ermöglichen. Die Hintergrund-Sequenzen der Subtypen in dieser Analyse waren: u455 (Subtyp A), RL42 (chinesischer Subtyp B-Thai (B')), eth2220 (Subtyp C), z2d2 (Subtyp D), 93th2 (Subtyp A/E).

5 Beispiel 11:

Rekombination zwischen den Subtypen in der kodierenden Region für Gag-Pol von 97cn54

Auch wenn wesentliche Homologien zu den Virusstämmen des Subtyps C innerhalb der hochkonservierten Leserahmen von gag und pol beobachtet wurden, identifizierte die RIP-Analyse 3 Bereiche der intra-subtypischen Rekombination innerhalb gagpol um die Positionen
10 478-620, 1290-1830 und 2221-2520 oberhalb des Startkodons von gag. Diese verstreuten Abschnitte liegen innerhalb der Leserahmen von gag und pol und weisen höchste Homologien zu dem Prototyp B (Daten nicht gezeigt) und insbesondere zu einem Isolat des Subtyps B(B'), das aus Yunnan kommt (Figur 2), auf. Diese Beobachtung unterstreicht eindeutig die Wichtigkeit von RIP-Analysen, da einfache Homologie-Vergleiche auf der Basis von kompletten Genen nicht
15 in der Lage waren, diese kleinen verstreuten Fragmente eines anderen Subtyps zu identifizieren. Um die mittels RIP-Analyse erhaltenen Daten zu bestätigen, erstellten wir mehrere phylogenetische Stammbäume unter Verwendung der Regionen, die die Bereiche der vorgeschlagenen Rekombination entweder flankieren oder überspannen (Figur 3). Unter Verwendung mehrerer Standard-Vertreter verschiedener Subtypen und einiger ausgewählter
20 Primär-Isolaten des Subtyps C konnten alle vorgeschlagenen Bereiche der Rekombination bestätigt werden durch differenzielles Clustern von 97cn54 mit den jeweiligen Referenz-Isolaten der Subtypen C (Figuren 3 A, C, E, G) oder B (Figuren 3 B, D, F).

Beispiel 12:

25 Intersubtyp-Rekombination in der für env kodierenden Region von 97cn54

Wie die in Tabelle 2 zusammengefassten Sequenzvergleiche erwarten ließen, bestätigte die RIP-Analyse die Intersubtyp-Rekombination zwischen Subtyp (B')-Thai und C (Figur 4) eindeutig. Ein Fragment von etwa 1000 bp Länge, das sich von den 150 3'-terminalen bp von vpr über das erste Exon von tat und rev bis zu vpu erstreckt, zeigte das höchste Ausmaß an Homologie mit
30 dem Vertreter des lokalen Subtyps (B') (r142) (Figur 4 A). Darüber hinaus zeigte ein etwa 300 bp langer Sequenzbereich, der mit der 5'-Hälfte des Gens nef überlappt, höchste Homologie mit dem Subtyp (B')-Thai, wohingegen der verbleibende Teil einschließlich eines Fragments von 300 bp

Länge, der sich in die 3'-LTR-Region erstreckt, mit Subtyp C gruppiert (clustert) (Figur 4 B).

Unter Erweiterung der RIP-Analyse zeigten phylogenetischen Stammbäume die engste Verwandtschaft von vpr/vpu und dem 5'-Bereich des nef-Gens zu Isolaten des Subtyps B (Figur 5 A, B), wohingegen das 3'-nef-Fragment sich eindeutig mit Vertretern des Subtyps C gruppierte (Figur 5 C). Weitere Analysen bestätigten, daß die Sequenz des Subtyps B innerhalb dieses Mosaiks näher verwandt ist mit einem kürzlich beschriebenen Thai-(B')-Stamms (r142), der isoliert wurde von einem chinesischen IDU (Graf et al. 1998), als zu Prototyp-Isolaten des Subtyps B (mn und sf2) (Tabelle 2).

Beispiel 13:

Repräsentativer Charakter von 97cn54

In den kodierenden Regionen von vpr/vpu und dem nef-Gen von 97cn54 liegende Bruchstellen wurden in fast identischen Positionen bei allen Stämmen des Subtyps C, die aus in den nordwestlichen Provinzen von China lebenden IDUs isoliert wurden, gefunden. 2 RIP-Analysen, die repräsentativ für 8 unabhängig voneinander isolierte und analysierte HIV-1-Stämme von verschiedenen mit HIV-1 infizierten Personen in der autonomen Region Xinjiang isoliert wurden, sind in den Figuren 4 C und D dargestellt. Was die Herkunft von 97cn54 (Südwesten von China) und xj24 und xj15 (nordwestliches Gebiet) betrifft, legen diese Daten für die durch China zirkulierenden C/B'-rekombinanten Stämme einen gemeinsamen Vorläufer nahe. Unsere Ergebnisse zeigen also, daß 97cn54 ein C/(B')-Intersubtyp-Mosaikvirus mit 10 Bruchstellen der Intersubtyp-Rekombination darstellt, das unter den IDUs innerhalb der nordwestlichen Provinzen Chinas am stärksten prävalent ist. Eine schematische Darstellung des (B'/C)-Mosaikgenoms von Isolat 97cn545 ist in Figur 6 dargestellt.

Beispiel 14:

Vorhersage der über Subtypen hinaus kreuzreaktiven spezifischen Epitope für HIV-spezifische zytolytische T-Zellen

Genomische Sequenzen eröffnen die Möglichkeit, die Konserviertheit von bekannten CTL-Epitopen zu ermitteln, die einen Einfluß haben können auf die Effektivität von HIV-1-Impfstoffkandidaten. Die meisten Reagenzien und Daten bezüglich CTL-Epitopen stammen von Sequenzen von HIV-1_{LAI} des Subtyps B. Um die Konserviertheit von über Subtypen hinaus

kreuzreaktiven CTL-Epitopen abzuschätzen, wurden die vorhergesagten Protein-Sequenzen von 97cn54 mit den bekannten und am besten kartierten LAI-spezifischen CTL-Epitopen verglichen. Von den 194 beschriebenen CTL-Epitopen von HIV-1 liegen 75, 55, 40 und 24 in Gag, (p17, p24, p15), in der Reversen Transkriptase (RT), in gp120 bzw. in gp41. Während fast 50% oder

5 mehr der Epitope in Gag und RT völlig identisch sind, stimmten nur 5% und 17% der von HIV-1_{LAI} abgeleiteten CTL-Epitope von gp120 und gp41 exakt mit der für 97cn54 vorhergesagten Aminosäure-Sequenz überein. Wenn man jedoch zwei konservative Fehlpaarungen in einem bestimmten CTL-Epitop zuläßt, war ein zusätzlicher Bereich von 48% (p17), 33% (p24), 40% (RT), 57% (gp120) und 33% (gp41) der bekannten CTL-Epitope von HIV-1_{LAI} verwandt mit den

10 Sequenzen in den entsprechenden von 97cn54 abgeleiteten Polypeptiden. Natürlich muß diese letzte Betrachtung mit einiger Vorsicht aufgenommen werden, da sogar nicht-konservative Austausche die HLA-Bindung oder die T-Zell-Rezeptorerkennung eines antigenen Peptids beseitigen kann. Zusammengekommen sagen diese Beobachtungen jedoch eindeutig eine beträchtliche über die Subtypen hinaus kreuzreaktive CTL-Reaktivität voraus, insbesondere der

15 funktionell und immunologisch konservierten Proteine von HIV-1. Außerdem legen diese Daten nahe, daß ein beträchtlicher Anteil der Reagenzien (Peptide, Vakziniavirus-Konstrukte), die für die Kartierung und Charakterisierung von CTL-Epitopen des Subtyps B synthetisiert und etabliert worden sind, auch nützlich sein können für die Bestimmung von CTL-Reaktivitäten auf Basis von HIV-Sequenzen des Subtyps C.

20

Tabelle 3: Leserahmen der kodierenden Sequenz von 97cn54

Leserahmen	Start	Ende	Start	Ende
gag	177	1654		
pol	1447	4458		
env	5589	8168		
vif	4403	4984		
vpr	4924	5214		
vpu	5426	5671		
tat	5195	5409	7730	7821
rev	5334	5409	7730	7821
nef	8170	8790		

Die Nummern beziehen sich auf das 5'-Ende der in SEQ ID NO: 1 wiedergegebenen DNA Sequenz.

Beispiel 15:

5 (A) Beschreibung der synthetischen kodierenden Region für C54gp160: C-gp160

Das C-gp120-Gen wurde in die einzigen KpnI/SacI-Restriktionsschnittstellen des pCR-Script amp(+)-Klonierungsvektors (Stratagene, Genbank Accession: U46017) kloniert. Die synthetische, im Kodongebrauch an stark exprimierte Säugergene angepaßte kodierende Region von C54gp160 ist in SEQ ID NO: 3 dargestellt. Die synthetische Signalsequenz kodiert ein

10 Transportsignal für den Import des kodierten Polypeptids in das endoplasmatische Retikulum.

Die Positionen der verschiedenen kodierenden Regionen sind wie folgt:

CDS	Start	Ende
synthetische Signalsequenz	28	87
gp160	88	2580

(B) Beschreibung der synthetischen Sequenz von C54 gagpolnef: C-gpnef

- 15 Das Gen C-gpnef wurde in die einzigen KpnI/SacI-Restriktionsschnittstellen des pCR-Script amp(+) Klonierungsvektors (Stratagene) kloniert. Die synthetische, im Kodongebrauch an stark exprimierte Säugergene angepaßte Sequenz von C54gagpolnef ist in SEQ ID NO: 2 dargestellt. In dem vorliegenden Konstrukt wurde das N-terminale Glycin gegen Alanin (Nukleotidsequenz GGC) ausgetauscht, um ein Targeting des Polypeptides an die Zytoplasmamembran und die
- 20 anschließende Sekretion von assemblierten Virus-ähnlichen Partikeln via Budding zu vermeiden. Gleichzeitig wurde an der natürlichen Frameshift-Sequenz ein (-1) Leserastersprung eingeführt, der ein obligates Durchlesen der Ribosomen aus dem Gag- in den Pol Leserahmen garantiert und so die Synthese eines GagPolNef Polyproteins sicherstellt.

Die Positionen der verschiedenen kodierenden Regionen sind wie folgt:

CDS	Start	Ende
gag	13	1500
5'pol (Δ RT)	1501	2460
<i>scrambled nef</i>	2461	3090
3'pol (Δ IN)	3091	4155
RT aktives Zentrum	4156	4266

Beispiel 16:

- 5 Das durch SEQ ID NO: 1 kodierte GagPolNef Polygen wurde über KpnI/XhoI in den Vektor pcDNA3.1 inseriert und in den E.coli Stamm XL1blue transformiert. Die Fähigkeit des GagPolNef Expressionsvektors eine Gag-spezifische Antikörperantwort zu induzieren wurde in weiblichen BALB/c Mäusen analysiert (Fig. 9). Zwei Gruppen von jeweils 5 Tieren erhielten jeweils eine intramuskuläre (i.m.) Primärimmunisierung von 100 µg DNA pro Immunisierung
- 10 gefolgt 2 i.m. Folgeimmunisierungen 3 und 6 Wochen später (Gruppe 1: pcDNA-GagPolNef; Gruppe 2: pcDNA). Eine Kontrollgruppe (Gruppe 3) wurde lediglich mit PBS immunisiert. Die Gesamtiter an Gag-spezifischem IgG wurden gegen gereinigtes Gag-Protein im ELISA bestimmt. Die Impfung mit pcDNA-GagPolNef resultierte in einer schnellen Induktion hoher Titer an Gag spezifischen Antikörpern (1:4.000), die gekennzeichnet war durch ein typisches
- 15 Th1 Profil an Antikörper Isotypen (IgG2a >> IgG1). Die beiden Kontrollgruppen 2 und 3 lieferten keine Hinweise auf die Generierung Gag-spezifischer Antikörper. Die Antikörpertiter stiegen beinahe um das hundertfache (1:20.000) 1 Woche nach der ersten Folgeimmunisierung und erreichten Gag-spezifische Endpunkttiter von 1:80.000 eine Woche nach der zweiten Boosterimmunisierung. Zu keinem Zeitpunkt konnte bei den beiden Kontrollgruppen eine
- 20 signifikante, Gag-spezifische Antikörperantwort nachgewiesen werden.

Beispiel 17:

Die Antigen-spezifische Zytokinsekretion als Hinweis auf die Induktion einer T-Helfer *Memory*-Antwort wurde aus Milzzellen analysiert, die jeweils 5 Tage nach der zweiten Folgeimmunisierung entnommen wurden. Die Milzzellen der Mäuse, die drei i.m. Immunisierungen mit pcDNA-GagPolNef erhalten hatten, reagierten mit einer deutlichen gIFN Sekretion auf Gag-spezifischen Antigenstimulus (Tabelle 3). Eine vergleichsweise reduzierte gIFN Produktion wurde Milzzellen beobachtet, die aus Mäusen nach dreimaliger subkutaner (s.c.) oder intradermaler (i.d.) Immunisierung mit pcDNA-GagPolNef nach dem selben Schema wie oben gewonnen wurden. In allen Immunisierungsgruppen wurden, unabhängig von der Immunisierungsrouten, keine nennenswerten IL-4- und IL-5 Sekreten aus den spezifisch *in vitro* restimulierten Milzzellen festgestellt. Eine Zytokinsekretion aus nicht-stimulierten Milzzellen wurde nicht beobachtet.

Die i.m. Immunisierung mit pcDNA-GagPolNef führte demnach zu einem starken Th1 Zytokin-Profil, während die subkutane Verabreichung eher eine schwache Th1 Antwort induzierte.

Tabelle 4: Zytokin-Profil von *in vitro* Gag-stimulierten Milzzellen von Mäusen 1 Immunisierung (Nadelinjektion) oder *i.d.* bzw. *s.c.* Immunisierung durch eine Part mit den angegebenen DNA Konstrukten

DNA Vakzine	IL-4 (pg/ml)	IL-5 (pg/ml)	IFN- γ (pg/ml)
pcDNA-GagPolNef (i.m.)	<8	<16	3220 \pm 840
pcDNA-GagPolNef (i.d.)	<8	<16	80 \pm 32
pcDNA-GagPolNef (s.c.)	<8	<16	<32

Mittelwerte \pm Standardabweichung von Milzzellen, gewonnen jeweils aus 5 Mäusen pro Experiment

Beispiel 18:

Um die Fähigkeit von pcDNA-GagPolNef zur Induktion Gag-spezifischer CTLs zu überprüfen wurden Milzzellen 3 Wochen nach einer primären Immunisierung mit pcDNA-GagPolNef (Gruppe 1), pcDNA (Gruppe 2) und PBS (Gruppe 3) *in vitro* in einer gemischten-Lymphozyten-Tumor-Zellkultur für 6 Tage spezifisch restimuliert und anschließend hinsichtlich ihrer zytotoxischen Aktivität untersucht. Bei dem nonameren, vom Gag Protein der Subtyp B-Viren

(IIIB-Isolat) abgeleiteten AMQMLKETI Peptid (Einbuchstabencode), das in diesem Versuch zur *in vitro* Restimulation gleichwie zur Bestimmung der spezifischen zytotoxischen Aktivität eingestzt wurde, stellt bekannterweise ein D^d-restringiertes CTL Epitope in der BALB/c Maus dar. Gag-spezifische zytotoxische T-Zellen konnten nach einer einmaligen i.m. Injektion mit dem pcDNA-GagPolNef Plasmid, nicht jedoch in einer der beiden Kontrollgruppen 2 und 3 festgestellt werden. Die Behandlung von Milzzellen mit dem oben genannten Peptid resultierte nicht in einem *in vitro* Priming Gag-spezifischer zytotoxischer T-Zellen. Diese Ergebnisse bestätigen (i) die Fähigkeit von pcDNA-GagPolNef zur Induktion Spezifischer zytotoxischer T-Zellen, die (ii) Subtyp-übergreifend aktiv sind (Figur 9).

Literatur

Bai, X., Su, L., Zhang, Y., and et al(1997). Subtype and sequence analysis of the C2V3 region of gp120 gene among HIV-1 strains in Xinjiang. *Chin. J. Virology* 13.

Carr, J. K., Salminen, M. O., Koch, C., Gotte, D., Artenstein, A. W., Hegerich, P. A., St Louis, D., Burke, D. S., and McCutchan, F. E.(1996). Full-length sequence and mosaic structure of a human immunodeficiency virus type 1 isolate from Thailand. *J. Virol.* 70, 5935-5943.

Carr, J. K., Salminen, M. O., Albert, J., Sanders Buell, E., Gotte, D., Bix, D. L., and McCutchan, F. E.(1998). Full genome sequences of human immunodeficiency virus type 1 subtypes G and A/G intersubtype recombinants. *Virology* 247, 22-31.

Esparza, J., Osmanov, S., and Heyward, W. L.(1995). HIV preventive vaccines. Progress to date. *Drugs* 50, 792-804.

Expert group of joint United Nations programme on HIV/AIDS(1999). Implications of HIV variability for transmission: scientific and policy issues. *AIDS* 11, UNAIDS 1-UNAIDS 15.

Gao, F., Robertson, D. L., Morrison, S. G., Hui, H., Craig, S., Decker, J., Fultz, P. N., Girard, M., Shaw, G. M., Hahn, B. H., and Sharp, P. M.(1996). The heterosexual human immunodeficiency virus type 1 epidemic in Thailand is caused by an intersubtype (A/E) recombinant of African origin. *J. Virol.* 70, 7013-7029.

Gao, F., Robertson, D. L., Carruthers, C. D., Morrison, S. G., Jian, B., Chen, Y., Barre Sinoussi, F., Girard, M., Srinivasan, A., Abimiku, A. G., Shaw, G. M., Sharp, P. M., and Hahn, B. H.(1998). A comprehensive panel of near-full-length clones and reference sequences for non-subtype B isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 72, 5680-5698.

Gaywee, J., Artenstein, A. W., VanCott, T. C., Trichavaroj, R., Sukchamnong, A., Amlee, P.,

- de Souza, M., McCutchan, F. E., Carr, J. K., Markowitz, L. E., Michael, R., and Nittayaphan, S.(1996). Correlation of genetic and serologic approaches to HIV-1 subtyping in Thailand. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **13**, 392-396.
- Graf, M., Shao, Y., Zhao, Q., Seidl, T., Kostler, J., Wolf, H., and Wagner, R.(1998). Cloning and
5 characterization of a virtually full-length HIV type 1 genome from a subtype B'-Thai strain representing the most prevalent B-clade isolate in China. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **14**, 285-288.
- Graham, B. S. and Wright, P. F.(1995). Candidate AIDS vaccines. *N. Engl. J. Med.* **333**, 1331-1339.
- 10 Kostrikis, L. G., Bagdades, E., Cao, Y., Zhang, L., Dimitriou, D., and Ho, D. D.(1995). Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 strains from patients in Cyprus: identification of a new subtype designated subtype I. *J. Virol.* **69**, 6122-6130.
- Leitner, T. and Albert, J.(1995). *Human Retroviruses and AIDS 1995: a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences.* (Myers, G., Korber, B., Wain-Hobson, S.,
15 Jeang, K., Mellors, J., McCutchan, F., Henderson, L., and Pavlakis, G. Eds.) Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, N. Mex. III147-III150.
- Lole, K. S., Bollinger, R. C., Paranjape, R. S., Gadkari, D., Kulkarni, S. S., Novak, N. G., Ingersoll, R., Sheppard, H. W., and Ray, S. C.(1999). Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype
20 recombination. *J. Virol.* **73**, 152-160.
- Loussert Ajaka, I., Chaix, M. L., Korber, B., Letourneur, F., Gomas, E., Allen, E., Ly, T. D., Brun Vezinet, F., Simon, F., and Saragosti, S.(1995). Variability of human immunodeficiency virus type 1 group O strains isolated from Cameroonian patients living in France. *J. Virol.* **69**, 5640-5649.
- 25 Luo, C. C., Tian, C., Hu, D. J., Kai, M., Dondero, T., and Zheng, X.(1995). HIV-1 subtype C in China [letter]. *Lancet* **345**, 1051-1052.
- Myers, G., Korber, B., Foley, B., Jeang, K. T., Mellors, J. W., and Wain Hobson, S.(1996). *Human retroviruses and AIDS: a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences.* (Anonymous Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos, N. Mex.
- 30 Salminen, M. O., Koch, C., Sanders Buell, E., Ehrenberg, P. K., Michael, N. L., Carr, J. K., Burke, D. S., and McCutchan, F. E.(1995). Recovery of virtually full-length HIV-1 provirus of diverse subtypes from primary virus cultures using the polymerase chain reaction. *Virology* **213**,

80-86.

Shao, Y., Zhao, Q., Wang B., and et al(1994). Sequence analysis of HIV env gene among HIV infected IDUs in Yunnan epidemic area of China. *Chin. J. Virology* 10, 291-299.

Shao, Y., Su, L., Sun, X., and et al(1998). Molecular Epidemiology of HIV infection in China.

5 12th world AIDS conference, Geneva 13132, (Abstract).

Shao, Y., Guan, Y., Zhao, Q., and et al(1999). Genetic variation and molecular epidemiology of the Ruili HIV-1 strains of Yunnan in 1995. *Chin. J. Virol.* 12, 9.

Sharp, P. M., Robertson, D. L., and Hahn, B. H.(1995). Cross-species transmission and recombination of 'AIDS' viruses. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 349, 41-47.

10 Sharp, P. M., Bailes, E., Robertson, D. L., Gao, F., and Hahn, B. H.(1999). Origins and evolution of AIDS viruses. *Biol. Bull.* 196, 338-342.

World Health Organisation Network for HIV Isolation and Characterization(1994). HIV-1 variation in WHO-sponsored vaccine-evaluation sites:genetic screening, sequence analysis and preliminary biological characterization of selected viral strains. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*

15 10, 1327-1344.

Yu, H., Su, L., and Shao, Y.(1997). Identification of the HIV-1 subtypes by HMA and sequencing. *Chin. J. Epidemiol.* 18, 201-204.

Patentansprüche

1. Ein Polynukleotid umfassend eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:1, 2 oder 3
oder dessen Fragment oder Derivat, oder ein Polynukleotid, das mit der
5 Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:1, 2 oder 3 hybridisiert.
2. Polynukleotid oder dessen Fragment oder Derivat nach Anspruch 1, wobei das
hybridisierende Polynukleotid unter stringenten Bedingungen mit der
Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:1, 2 oder 3 hybridisiert.
- 10 3. Polynukleotid oder dessen Fragment oder Derivat nach Anspruch 1 oder 2, umfassend
mindestens eine kontinuierliche Sequenz von mindestens 9 Nukleotiden, bevorzugt
mindestens 15, mehr bevorzugt mindestens 27, oder mehr Nukleotide.
- 15 4. Polynukleotid oder dessen Fragment oder Derivat nach Anspruch 3 mit mehr als einer
kontinuierlichen Sequenz von Nukleotiden, wobei mindestens zwei der kontinuierlichen
Sequenzen durch einen Nukleotid-Platzhalter ("spacer") getrennt sind.
5. Polynukleotid oder dessen Fragment oder Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
20 welches für wenigstens ein Polypeptid kodiert, welches kodiert wird durch die unter SEQ
ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 3 beschriebene Nukleotidsequenz.
6. DNA-Konstrukte, umfassend das Polynukleotid oder dessen Fragment oder Derivat nach
einem der Ansprüche 1 bis 5.
- 25 7. Bakterieller oder viraler Vektor, umfassend das Polynukleotid oder dessen Fragment oder
Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 5.
8. Polynukleotid oder dessen Fragment oder Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 5 als
30 Arzneimittel, Impfstoff oder Diagnostikum.
9. Verwendung des Polynukleotids oder dessen Fragments oder Derivats nach einem der

Ansprüche 1 bis 5 zur Herstellung eines Arzneimittels oder Impfstoffs für die Behandlung oder Prävention von HIV-Infektionen.

- 5 10. Polypeptid, kodiert von der Nukleotidsequenz oder Fragment oder Derivat der Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO:1, 2 oder 3.
11. Polypeptid nach Anspruch 10, umfassend eine kontinuierliche Sequenz von von mindestens 8 Aminosäuren, die von der Nukleotidsequenz oder Fragmenten oder Derivaten der Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO:1, 2 oder 3 kodiert werden.
- 10 12. Polypeptid nach Anspruch 10 oder 11, wobei die Aminosäuresequenz dem HIV-Hüllprotein oder einem Fragment des HIV-Hüllproteins entspricht.
13. Polypeptid nach einem der Ansprüche 10 bis 12, ferner umfassend eine antigene Determinante, die natürlicherweise in Infizierten eine Immunreaktion auslöst.
- 15 14. Polypeptid nach Anspruch 13, wobei die antigene Determinante ein Konformations-Epitop oder ein lineares Epitop ist.
- 20 15. Das Polypeptid nach einem der Ansprüche 10 bis 14 als Arzneimittel, Impfstoff oder Diagnostikum.
- 16 16. Verwendung des des Polypeptids nach einem der Ansprüche 10 bis 14 zur Herstellung eines Arzneimittels oder Impfstoffs für die Behandlung oder Prävention von HIV-Infektionen.
- 25 17. Isoliertes Polypeptid spezifisch gegen ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 10 bis 14.
- 30 18. Isoliertes Polypeptid nach Anspruch 17 als Arzneimittel oder Diagnostikum.
19. Verwendung des isolierten Polypeptids nach Anspruch 17 zur Herstellung eines

Arzneimittels für die Behandlung oder Prävention von HIV-Infektionen.

20. Isoliertes Polypeptid nach Anspruch 17 oder 18 oder die Verwendung des isolierten Polypeptids nach Anspruch 19, wobei das isolierte Polypeptid ein Antikörper ist.

Fig. 1

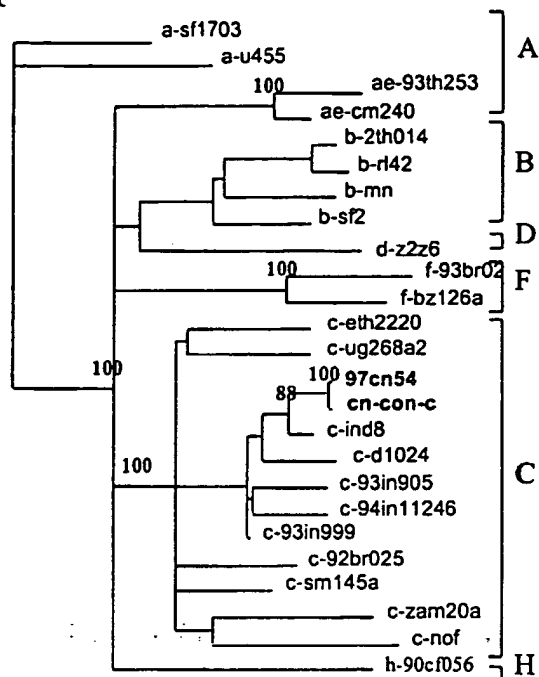
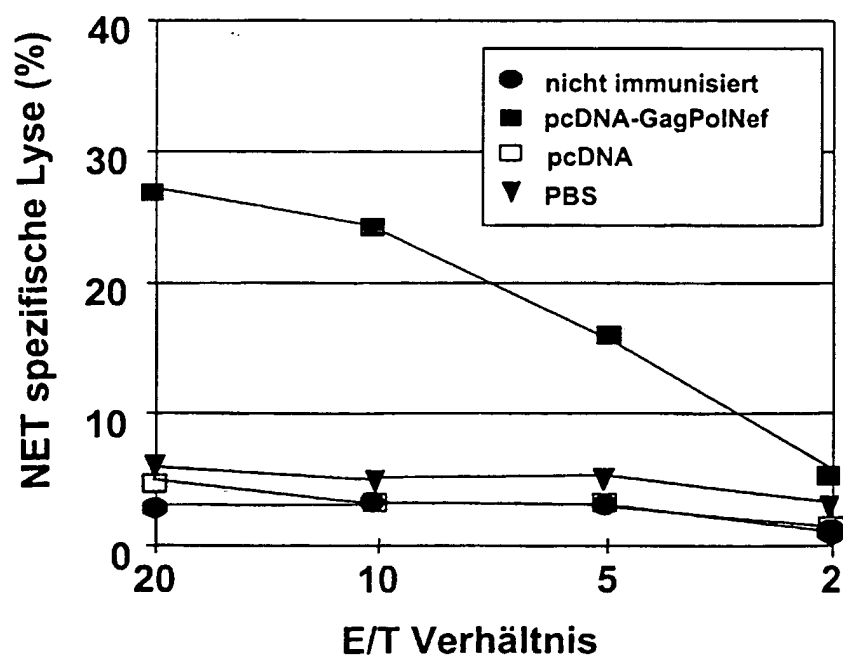


Fig. 9



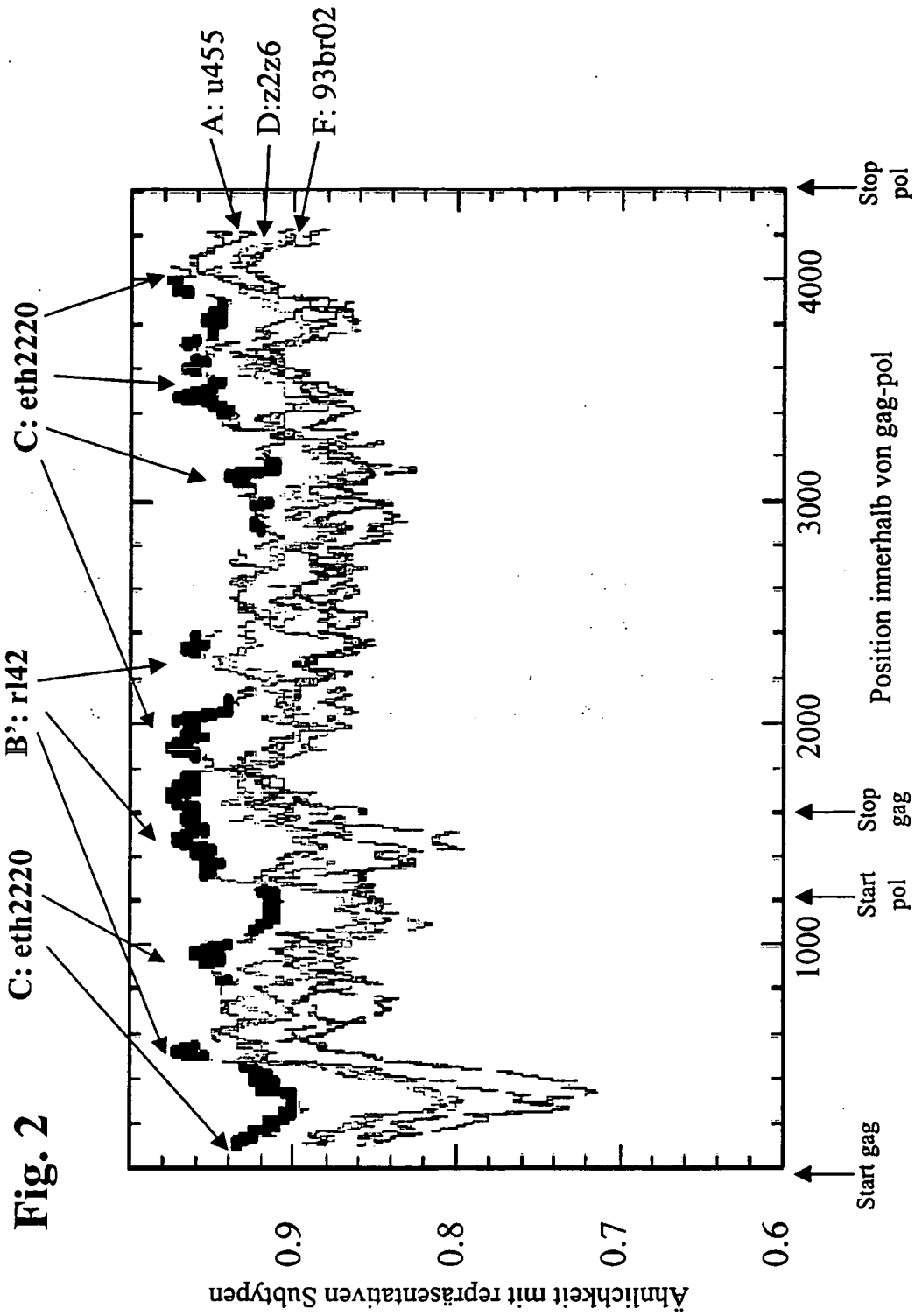
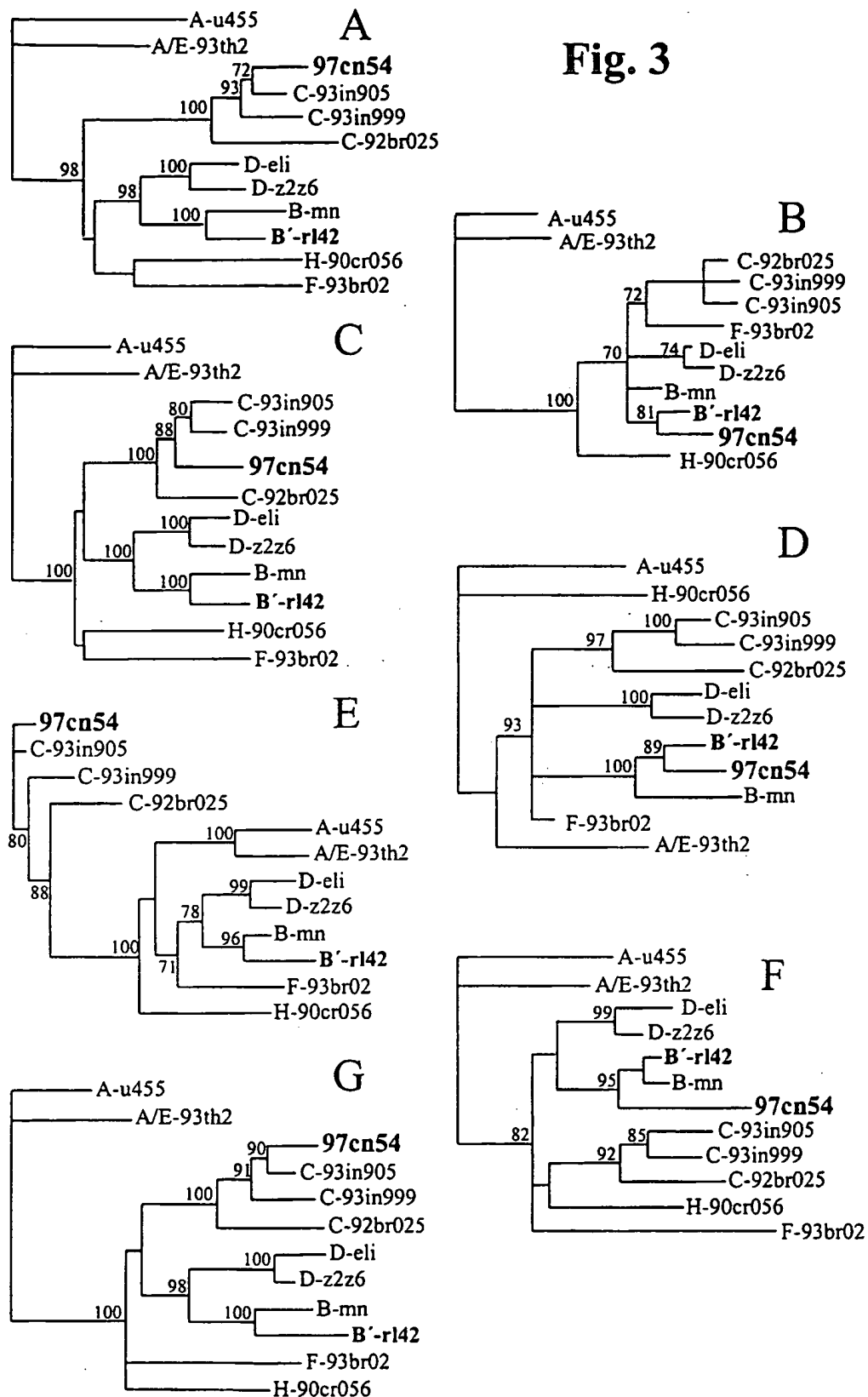


Fig. 3



4/27

Fig. 4 A

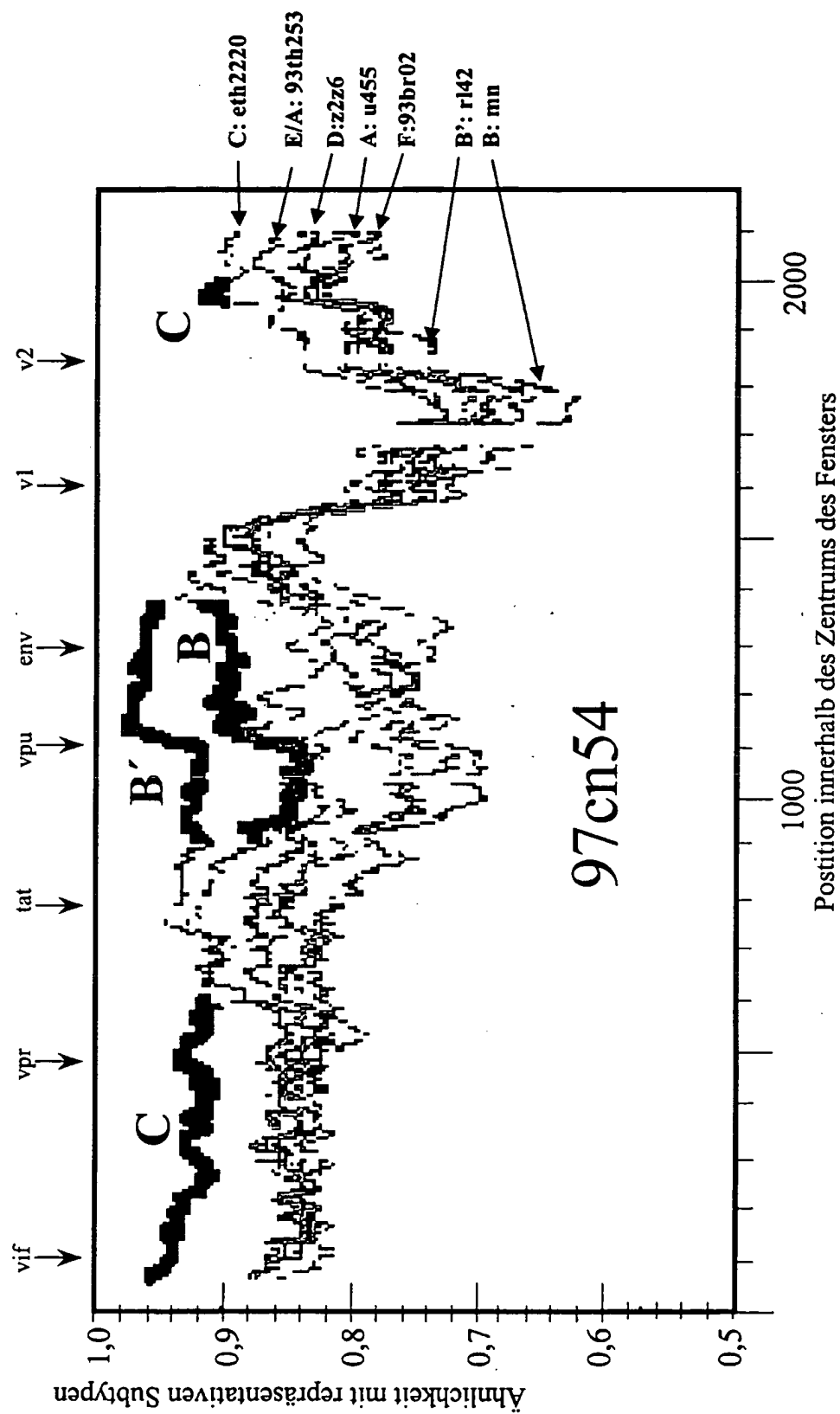
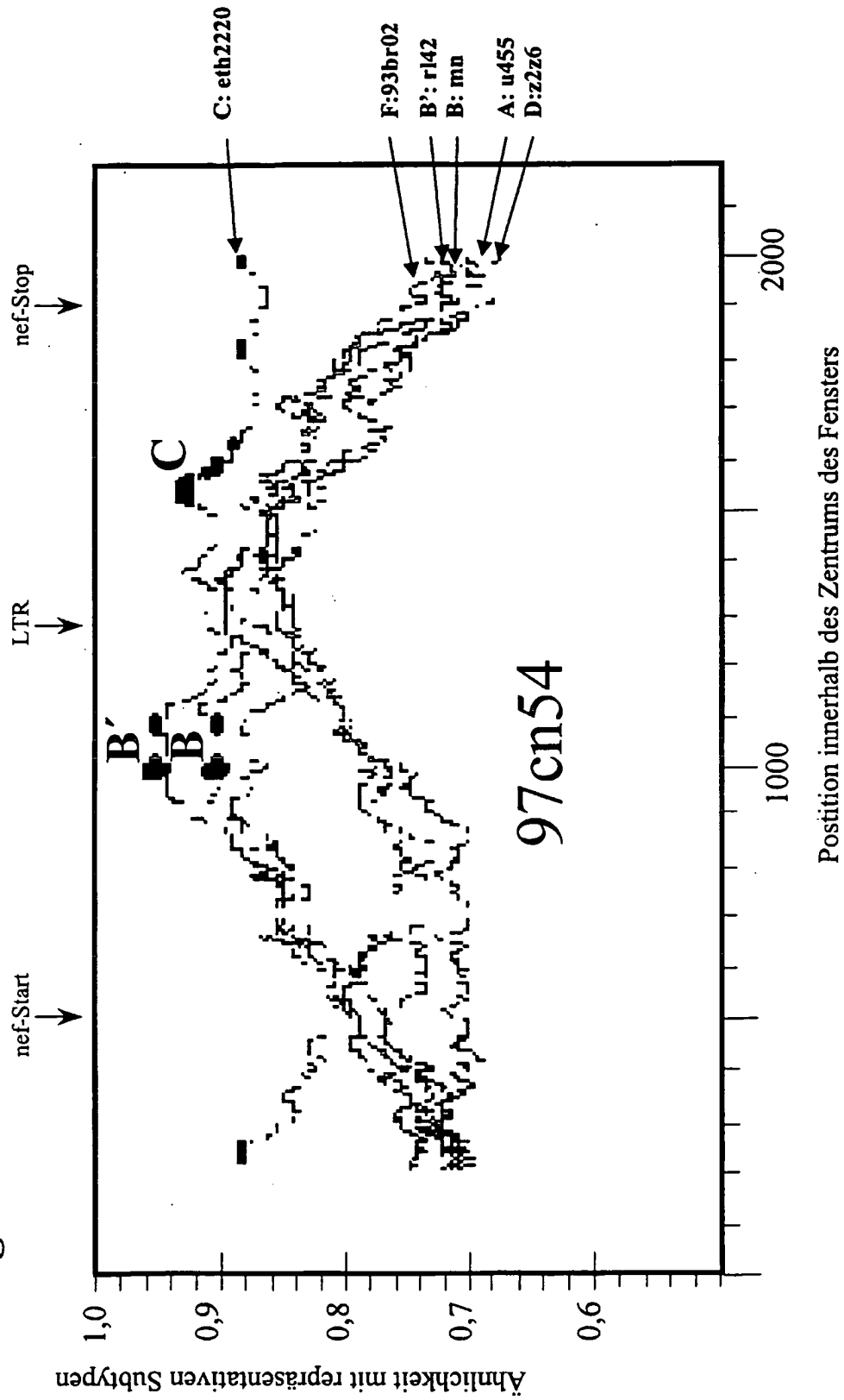
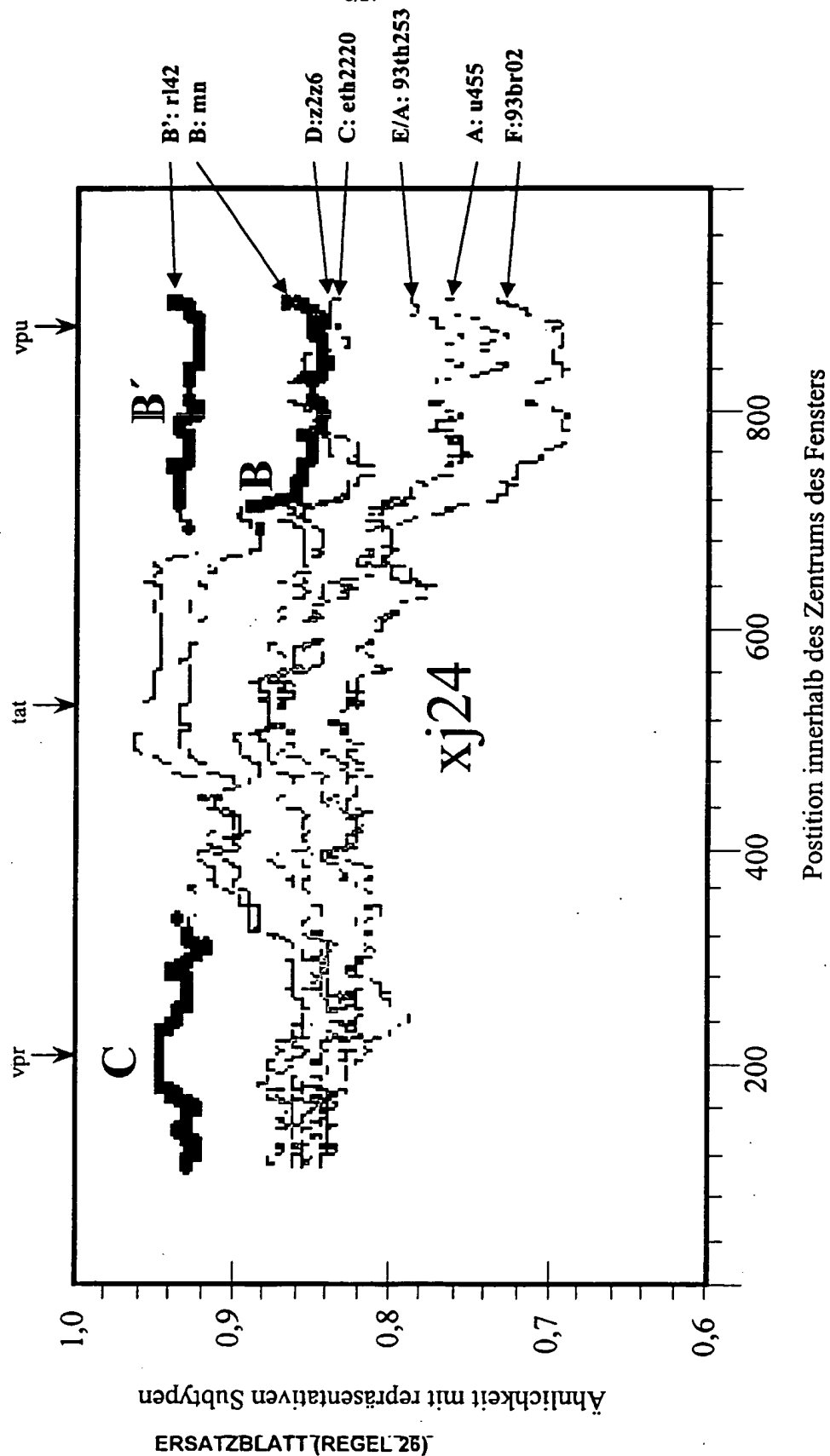


Fig. 4 B



6/27

Fig. 4 C



7/27

Fig. 4 D

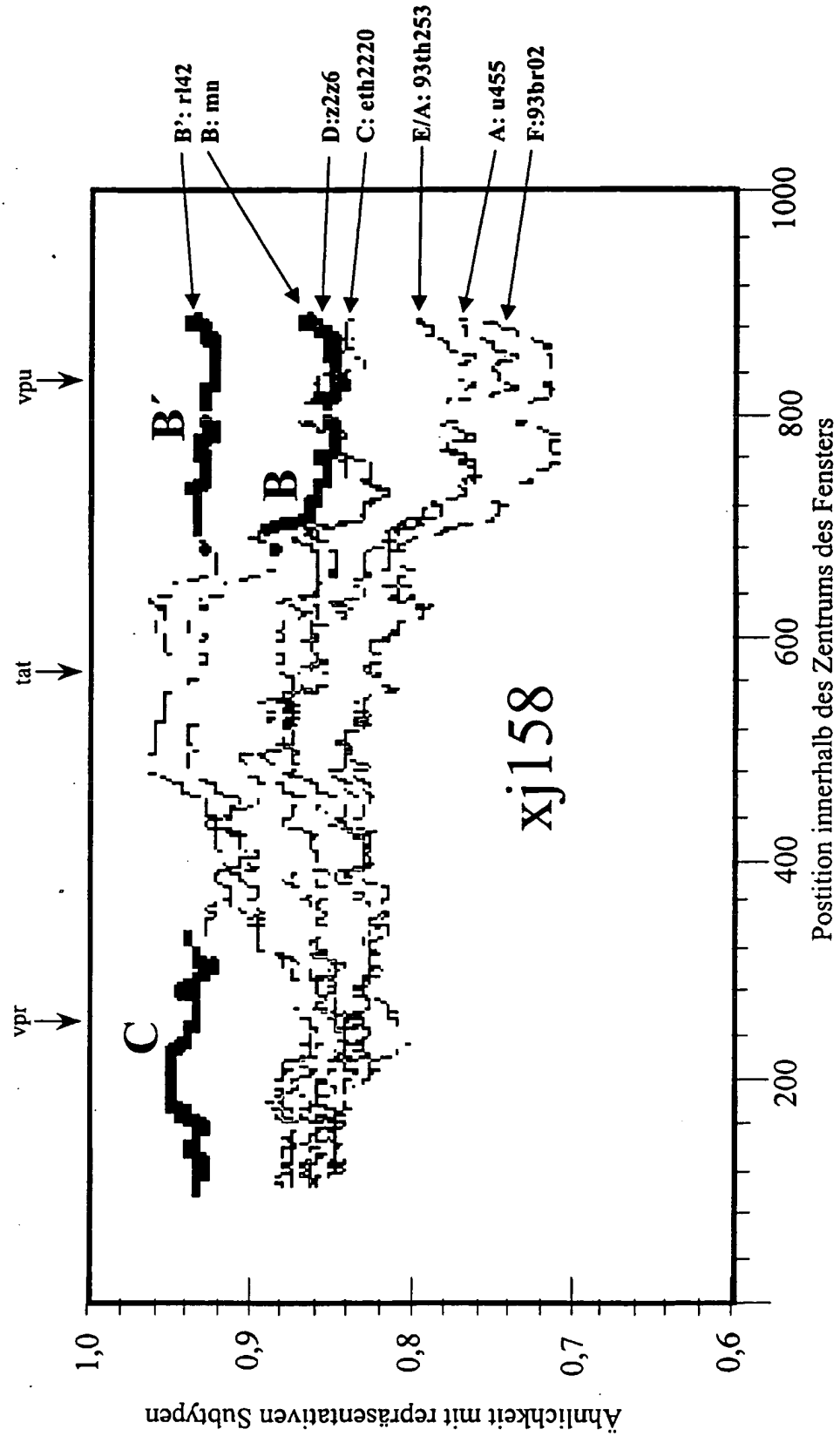


Fig. 5

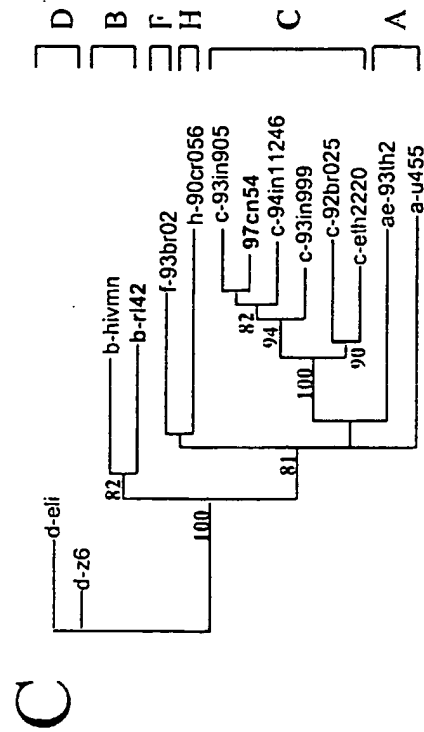
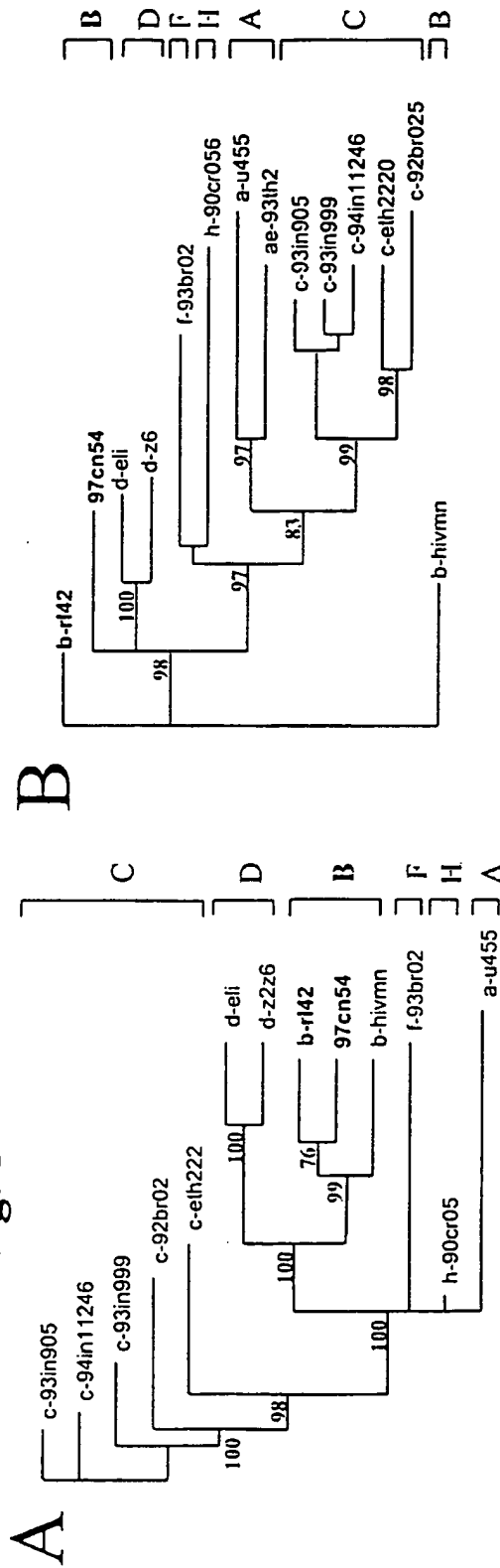


Fig. 6

Mosaikartige Organisation des Genoms von 97cn54

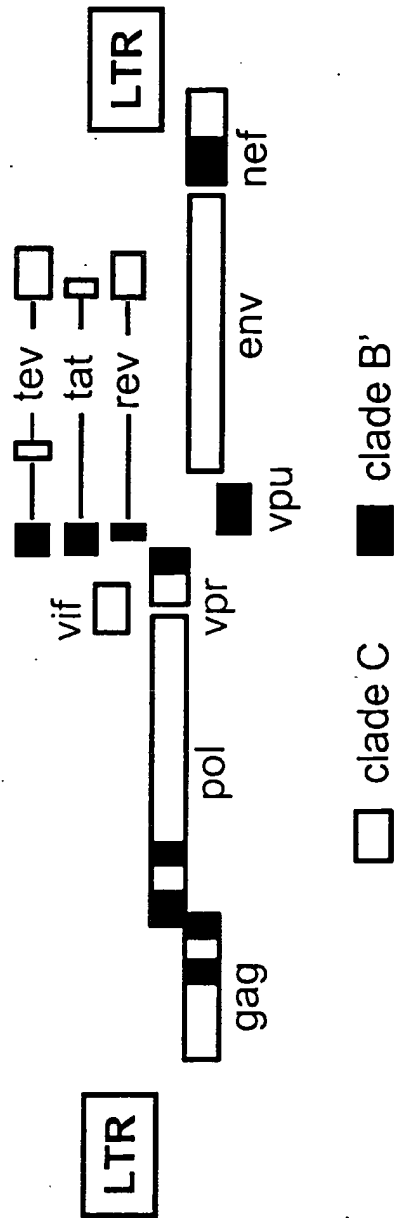


Fig. 7

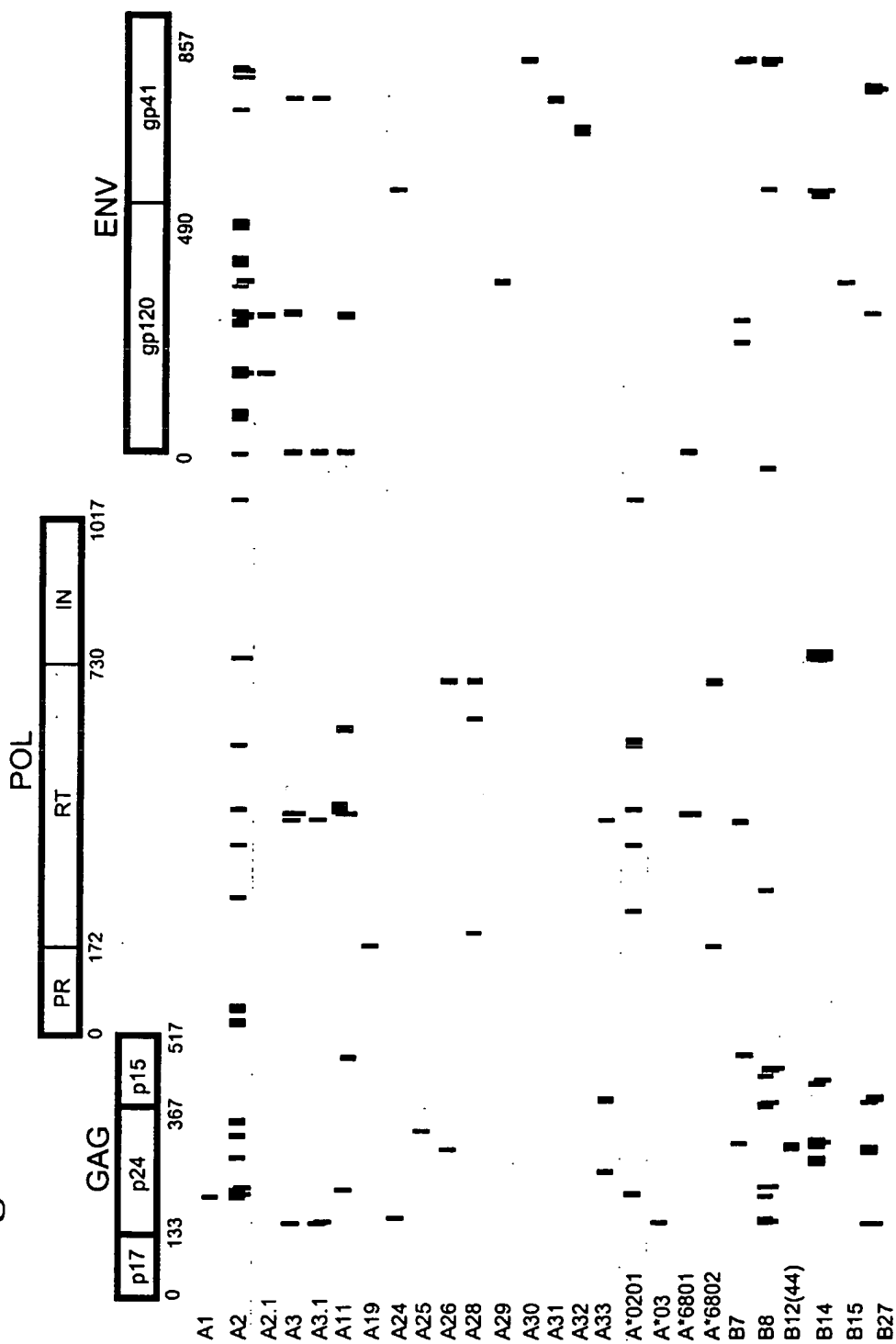
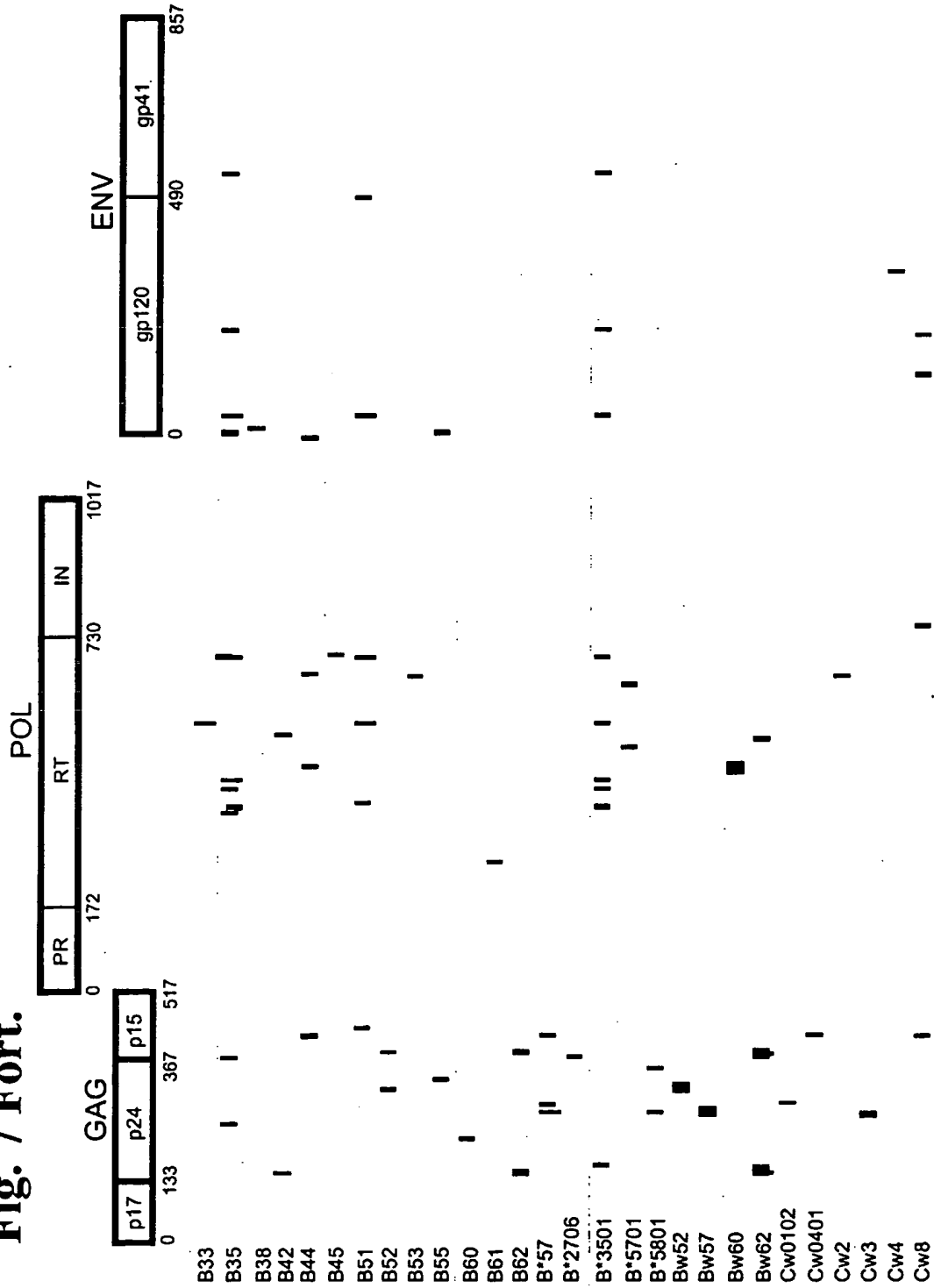


Fig. 7 Fort.



12/27

Fig. 8/a

[illegible]

Fig. 8/b

```

CAGTCAAAATTATCCTATAGTACAGAATCTCCAAGGGCAAATGGTACATCAGCCCATATC
541 -----+-----+-----+-----+-----+ 600
GTCAGTTTTAATAGGATATCATGTCTTAGAGGTTCCCGTTTACCATGTAGTCGGGTATAG
a Q S K L S Y S T E S P R A N G T S A H I -
b S Q N Y P I V Q N L Q G Q M V H Q P I S -
c V K I I L * Y R I S K G K W Y I S ' P Y H -

ACCTAGAACTTTAAATGCATGGGTAAAAGTGGTAGAAGAGAAGGCTTTTAGCCCAAGT
601 -----+-----+-----+-----+-----+ 660
TGGATCTTGAAATTTACGTACCCATTTTACCATCTTCTCTCCGAAAATCGGGTCTTCA
a T * N F K C M G K S G R R E G F * P R S -
b P R T L N A W V K V V E E K A F S P E V -
c L E L * M H G * K W * K R R L L A Q K * -

AATACCCATGTTTTTCAGCGTTATCAGAAGGAGCCACCCACAAGATTTAAACACCATGCT
661 -----+-----+-----+-----+-----+ 720
TTATGGGTACAAAAGTCGCAATAGTCTTCTCGGTGGGGTGTCTAAATTTGGGTACGA
a N T H V F S V I R R S H P T R F K H H A -
b I P M F S A L S E G A T P Q D L N T M L -
c Y P C F Q R Y Q K E P P H K I * T P C * -

AAACACAGTGGGGGACATCAAGCAGCTATGCAAATATTAAGATACCATCAATGAAGA
721 -----+-----+-----+-----+-----+ 780
TTTGTTGTCACCCCTGTAGTTTCGTGATACGTTTATAATTTCTATGGTAGTTACTTCT
a K H S G G T S S S Y A N I K R Y H Q * R -
b N T V G G H Q A A M Q I L K D T I N E E -
c T Q W G D I K Q L C K Y * K I P S M K R -

GGCTGCAGAATGGGATAGATTACATCCAGTACATGCAGGGCCTATTGCACCAGGCCAAAT
781 -----+-----+-----+-----+-----+ 840
CCGACGTCTTACCCATCTAATGTAGGTCATGTACGTCCCGGATAACGTGGTCCGGTTTA
a G C R M G * I T S S T C R A Y C T R P N -
b A A E W D R L H P V H A G P I A P G Q M -
c L Q N G I D Y I Q Y M Q G L L H Q A K * -

GAGAGAACCAAGGGGAAGTGACATAGCAGGAACCTACTAGTAACCTACAGGAACAAATAGC
841 -----+-----+-----+-----+-----+ 900
CTCTCTTGGTTCCCTTCACTGTATCGTCCTTGATGATCATTGGATGTCCTTGTATTATCG
a E R T K G K * H S R N Y * * P T G T N S -
b R E P R G S D I A G T T S N L Q E Q I A -
c E N Q G E V T * Q E L L V T Y R N K * H -

ATGGATGACGAGTAACCCACCTGTTCCAGTAGGAGACATCTATAAAGATGGATAATTCT
901 -----+-----+-----+-----+-----+ 960
TACCTACTGCTCATTGGGTGGACAAGGTCATCCTCTGTAGATATTTCTACCTATTAAGA
a M D D E * P T C S S R R H L * K M D N S -
b W M T S N P P V P V G D I Y K R W I I L -
c G * R V T H L F Q * E T S I K D G * F W -

GGGATTAATAAATAGTAAGAATGTATAGCCCTACCAGCATTCTGGACATAAAACAAGG
961 -----+-----+-----+-----+-----+ 1020
CCCTAATTTATTTATCATTCTTACATATCGGGATGGTCGTAAGACCTGTATTTTGTTC
a G I K * N S K N V * P Y Q H S G H K T R -
b G L N K I V R M Y S P T S I L D I K Q G -
c D * I K * * E C I A L P A F W T * N K G -

GCCAAAGGAACCTTTAGAGACTATGTAGACCGGTTCTTTAAACTTTAAGAGCGGAACA
1021 -----+-----+-----+-----+-----+ 1080
CGGTTTCTTGGGAAATCTCTGATACATCTGGCCAAGAAATTTGAAATTTCTCGCCTTGT
a A K G T L * R L C R P V L * N F K S G T -
b P K E P F R D Y V D R F F K T L R A E Q -
c Q R N P L E T M * T G S L K L * E R N K -

AGCTACGCAAGGTGTAAAAAATTGGATGACAGACACCTTGTGGTCCAAATGCGAACCC
1081 -----+-----+-----+-----+-----+ 1140
TCGATGCGTTCCACATTTTAACTACTGTCTGTGGAACAACCAGGTTTACGCTTGGG
a S Y A R C K K L D D R H L V G P K C E P -
b A T Q G V K N W M T D T L L V Q N A N P -
c L R K V * K I G * Q T P C W S K M R T Q -

```

Fig. 8/c

```

AGATTGTAAGACCATTTTAAGAGCATTAGGACCAGGGGCTTCAATAGAAGAAATGATGAC
1141 -----+----- 1200
TCTAACATTCTGGTAAAATTCTCGTAATCCTGGTCCCCGAAGTTATCTTCTTTACTACTG
a R L * D H F K S I R T R G F N R R N D D -
b D C K T I L R A L G P G A S I E E M M T -
c I V R P F * E H * D Q G L Q * K K * * Q -

AGCATGTCAGGGAGTGGGAGGACCTAGCCATAAAGCAAAAGTGTGGCCGAGGCAATGAG
1201 -----+----- 1260
TCGTACAGTCCCTCACCTCCTGGATCGGTATTCGTTTTCACAACCGGCTCCGTTACTC
a S M S G S G R T * P * S K S V G R G N E -
b A C Q G V G G P S H K A K V L A E A M S -
c H V R E W E D L A I K Q K C W P R Q * A -

CCAAACAAACAGTGCCATACTGATGCAGAGAAGCAATTTAAAGGCTCTAAAAGAATTGT
1261 -----+----- 1320
GGTTTGTGTTGTCACGGTATGACTACGTCTCTCGTTAAATTTCCGAGATTTTCTTAACA
a P N K Q C H T D A E K Q F * R L * K N C -
b Q T N S A I L M Q R S N F K G S K R I V -
c K Q T V P Y * C R E A I L K A L K E L L -
TAAATGTTTCAACTGTGGCAAGGAAGGGCACATAGCCAGAAATTGCAGGGCCCTAGGAA
1321 -----+----- 1380
ATTTACAAAGTTGACACCGTTCCTTCCCGTGTATCGGTCTTTAACGTCCCGGGGATCCTT
a * M F Q L W Q G R A H S Q K L Q G P * E -
b K C F N C G K E G H I A R N C R A P R K -
c N V S T V A R K G T * P E I A G P L G K -

AAAGGGCTGTTGGAATGTGGAAGAAGGACACCAATGAAAGATTGTACTGAGAGACA
1381 -----+----- 1440
TTTCCCGACAACTTTACACCTTTCTTCTGTGGTTTACTTTCTAACATGACTCTCTGT
a K G L L E M W K R R T P N E R L Y * E T -
b K G C W K C G K E G H Q M K D C T E R Q -
c R A V G N V E K K D T K * K I V L R D R -

GGCCAAATTTTtagggAAATCTGGCCCTCCCAAGGGAGGGCCAGGAATTTTCTTCA
1441 -----+----- 1500
CCGTTTAAAAAATCCCTTTTAGACCGGGAGGGTGTTCCTCCCGTCCCTTAAAGAAGT
a G Q F F R E N L A L P Q G R A R E F S S -
b A N F L G K I W P S H K G G P G N F L Q -
c P I F * G K S G P P T R E G Q G I F F R -

GAACAGACCAGAGCCAACAGCCCCACCAGAGGAGAGCTTCAGGTTTGgGGAAGAGACAAC
1501 -----+----- 1560
CTTGTCTGCTCTCGGTTGTGGGGTGGTCTCCTCTCGAAGTCCAAACcCCTTCTCTGTG
a E Q T R A N S P T R G E L Q V W G R D N -
b N R P E P T A P P E E S F R F G E E T T -
c T D Q S Q Q P H Q R R A S G L G K R Q Q -

AACTCCATCTCAGAAGCAGGAGCCAATAGACAAGGAATATATCCTTTAACTTCCCTCAA
1561 -----+----- 1620
TTGAGGTAGAGTCTTCGTCTCGGTTATCTGTTCTTGATATAGGAAATTGAAGGGAGTT
a N S I S E A G A N R Q G T I S F N F P Q -
b T P S Q K Q E P I D K E L Y P L T S L K -
c L H L R S R S Q * T R N Y I L * L P S N -

ATCACTCTTTGGCAACGACCCCTCGTCACAATAAAGATAGGGGGGCAATTAAAGGAAGCT
1621 -----+----- 1680
TAGTGAGAAACCGTTGCTGGGGAGCAGTGTATTTCTATCCCCCGTTAATTTCTTCTGA
a I T L W Q R P L V T I K I G G Q L K E A -
b S L F G N D P S S Q * R * G G N * R K L -
c H S L A T T P R H N K D R G A I K G S S -

CTATTAGATACAGGAGCAGGTGATACAGTATTAGAAGACCTGAATTTGCCAGGGAAATGG
1681 -----+----- 1740
GATAATCTATGTCTCGTCCACTATGTCTATAATCTTCTGACTTAAACGGTCCCTTTACC
a L L D T G A G D T V L E D L N L P G K W -
b Y * I Q E Q V I Q Y * K T * I C Q G N G -
c I R Y R S R * Y S I R R P E F A R E M E -

```

Fig. 8/d

AAACCAAAAATGATAGGGGAATTGGAGGTTTTATCAAAGTAAGACAGTATGAACAGATA
1741 -----+-----+-----+-----+-----+ 1800
TTTGGTTTTACTATCCCCCTTAACCTCCAAAATAGTTTCATTCTGTCTACTTGTCTAT
a K P K M I G G I G G F I K V R Q Y E Q I -
b N Q K * * G E L E V L S K * D S M N R Y -
c T K N D R G N W R F Y Q S K T V * T D T -
CCCATAGAAAATTTGCGGACACAAAGCTATAGGTACAGTATTAGTAGGACCTACACCTGTC
1801 -----+-----+-----+-----+-----+ 1860
GGGTACTCTTTAAACGCCTGTGTTTCGATATCCATGTCATAATCATCTGGATGTGGACAG
a P I E I C G H K A I G T V L V G P T P V -
b P * K F A D T K L * V Q Y * * D L H L S -
c H R N L R T Q S Y R Y S I S R T Y T C Q -
AACATAATTGGAAGAAATCTGTTGACTCAGCTTGGTTGCACTTTAAATTTTCCAATCAGT
1861 -----+-----+-----+-----+-----+ 1920
TTGTATTAACCTTCTTTAGACAAGTGAAGTGAACCAACGTGAAATTTAAAGGTTAGTCA
a N I I G R N L L T Q L G C T L N F P I S -
b T * L E E I C * L S L V A L * I F Q S V -
c H N W K K S V D S A W L H F K F S N Q S -
CCCATTGAAACTGTACCAGTAAAATTAAGCCAGGAATGGATGGCCCAAAGGTTAAACAA
1921 -----+-----+-----+-----+-----+ 1980
GGGTAACTTTGACATGGTCAATTTTAAATTTTCGGTCTTACCTACCGGTTTCCAATTTGTT
a P I E T V P V K L K P G M D G P K V K Q -
b P L K L Y Q * N * S Q E W M A Q R L N N -
c H * N C T S K I K A R N G W P K G * T M -
TGGCCATTGACAGAAGAGAAAATAAAGCATTAAACAGCAATTTGTGATGAAATGGAGAAA
1981 -----+-----+-----+-----+-----+ 2040
ACCGGTAACCTGTCTTCTTTTATTTTCGTAATGTGCTTAAACACTACTTTACCTCTTT
a W P L T E E K I K A L T A I C D E M E K -
b G H * Q K R K * K H * Q Q F V M K W R K -
c A I D R R E N K S I N S N L * * N G E R -
GAAGGAAAAATTACAAAAATTTGGGCCTGAAAATCCATATAACACTCCAATATTTGCCATA
2041 -----+-----+-----+-----+-----+ 2100
CTTCCTTTTAAATGTTTTAACCCTGACTTTTAGGTATATTGTGAGGTTATAAACGGTAT
a E G K I T K I G P E N P Y N T P I F A I -
b K E K L Q K L G L K I H I T L Q Y L P * -
c R K N Y K N W A * K S I * H S N I C H K -
AAAAAGAAGGACAGTACTAAGTGGAGAAAGTTAGTAGATTTTCAGGGAAGTCAATAAAGA
2101 -----+-----+-----+-----+-----+ 2160
TTTTCTTCTGTGTCATGATTCACCTCTTTCAATCATCTAAAGTCCCTTGAGTTATTTCT
a K K K D S T K W R K L V D F R E L N K R -
b K R R T V L S G E S * * I S G N S I K E -
c K E G Q Y * V E K V S R F Q G T Q * K N -
ACTCAAGATTTTGGGAAGTTCAATTAGGAATACCACCCAGCAGGGTTAAAAAGAAA
2161 -----+-----+-----+-----+-----+ 2220
TGAGTTCTAAAAACCTTCAAGTTAATCCTTATGGTGTGGGTCGTCCCAATTTTCTTT
a T Q D F W E V Q L G I P H P A G L K K K -
b L K I F G K F N * E Y H T Q Q G * K R K -
c S R F L G S S I R N T T P S R V K K E K -
AAATCAGTGACAGTACTGGATGTGGGGATGCATATTTTCAATTCCTTTATATGAAGAC
2221 -----+-----+-----+-----+-----+ 2280
TTTAGTCACTGTGATGACCTACACCCCTACGTATAAAAAGTTAAGGAAATATACTTCTG
a K S V T V L D V G D A Y F S I P L Y E D -
b N Q * Q Y W M W G M H I F Q F L Y M K T -
c I S D S T G C G G C I F F N S F I * R L -
TTCAGGAAGTATAGTGCATTACCATACCTAGTAGAAACAATGAAACACCAGGGATTAGG
2281 -----+-----+-----+-----+-----+ 2340
AAGTCCTTCATATGACGTAAGTGGTATGGATCATCTTTGTTACTTTGTGGTCCCTAATCC
a F R K Y T A F T I P S R N N E T P G I R -
b S G S I L H S P Y L V E T M K H Q G L G -
c Q E V Y C I H H T * * K Q * N T R D * V -

ERSATZBLATT (REGEL 26)

Fig. 8/f

```

2941  GAACCATTCAAAAATCTAAAAACAGGGAAGTATGCAAAAATGAGGACTGCCACACTAAT 3000
      CTTGGTAAGTTTTTAGATTTTGTCCCTTCATACGTTTTTACTCCTGACGGGTGTGATTA
a     E P F K N L K T G K Y A K M R T A H T N -
b     N H S K I * K Q G S M Q K * G L P T L M -
c     T I Q K S K N R E V C K N E D C P H * * -

      GATGTAAACAATTAACAGAGGCTGTGCAGAAAATAGCCATGGAAGGCATAGTAATATGG
3001  -----+-----+-----+-----+-----+ 3060
      CTACATTTTGTAAATTGTCTCCGACACGCTTTTATCGGTACCTTCCGTATCATTATACC
a     D V K Q L T E A V Q K I A M E G I V I W -
b     M * N N * Q R L C R K * P W K A * * Y G -
c     C K T I N R G C A E N S H G R H S N M G -

      GGAAAACTCCTAAATTTAGATTACCCATCCAAAAAGAAACATGGGAGACATGGTGGACA
3061  -----+-----+-----+-----+-----+ 3120
      CCTTTTGGAGATTAAATCTAATGGGTAGGTTTTTCTTTGTACCCTCTGTACCACCTGT
a     G K T P K F R L P I Q K E T W E T W W T -
b     E K L L N L D Y P S K K K H G R H G G Q -
c     K N S * I * I T H P K R N M G D M V D R -

      GACTATTGGCAAGCCACCTGGATTCTGAGTGGGAATTTGTTAATACCCCTCCCTTAGTA
3121  -----+-----+-----+-----+-----+ 3180
      CTGATAACCGTTTCGGTGGACCTAAGGACTCACCCCTTAAACAATTATGGGGAGGGAATCAT
a     D Y W Q A T W I P E W E F V N T P P L V -
b     T I G K P P G F L S G N L L I P L P * * -
c     L L A S H L D S * V G I C * Y P S L S K -

      AAATTATGGTACCAGCTGGAAAAAGATCCCATAGTAGGAGTAGAAACTTTCTATGTAGAT
3181  -----+-----+-----+-----+-----+ 3240
      TTTAATACCATGGTTCGACCTTTTCTAGGGTATCATCCTCATCTTTGAAAGATACATCTA
a     K L W Y Q L E K D P I V G V E T F Y V D -
b     N Y G T S W K K I P * * E * K L S M * M -
c     I M V P A G K R S H S R S R N F L C R W -

      GGAGCAGCTAATAGGGAGACTAAAATAGGAAAAGCAGGGTATGTTACTGACAGAGGAAGG
3241  -----+-----+-----+-----+-----+ 3300
      CCTCGTCGATTATCCCTCTGATTTTATCCTTTTCGTCCTACATAATGACTGTCTCCTTCC
a     G A A N R E T K I G K A G Y V T D R G R -
b     E Q L I G R L K * E K Q G M L L T E E G -
c     S S * * G D * N R K S R V C Y * Q R K E -

      AAGAAAATTGTTTCTCTAACTGAAACAACAAATCAGAAGACTGAATTGCAAGCAATTTGT
3301  -----+-----+-----+-----+-----+ 3360
      TTCTTTTAACAAAGAGATTGACTTTGTGTTTAGTCTTCTGACTTAACGTTTCGTTAAACA
a     K K I V S L T E T T N Q K T E L Q A I C -
b     R K L F L * L K Q Q I R R L N C K Q F V -
c     E N C F S N * N N K S E D * I A S N L Y -

      ATAGCTTTGCAAGATTACAGATCAGAAGTAAACATAGTAACAGATTACAGTATGCATTA
3361  -----+-----+-----+-----+-----+ 3420
      TATCGAAACGTTCTAAGTCCTAGTCTTCATTGTATCATTGTCTAAGTGTACATACGTAAT
a     I A L Q D S G S E V N I V T D S Q Y A L -
b     * L C K I Q D Q K * T * * Q I H S M H * -
c     S F A R F R I R S K H S N R F T V C I R -

      GGGATCATTCAAGCACACCAGATAAGAGTGAATCAGAGTTAGTTAACCRAATAATAGAA
3421  -----+-----+-----+-----+-----+ 3480
      CCCTAGTAAGTTTCGTGTTGGTCTATTCTCACTTAGTCTCAATCAATTGGTTATTATCTT
a     G I I Q A Q P D K S E S E L V N Q I I E -
b     G S F K H N Q I R V N Q S * L T K * * N -
c     D H S S T T R * E * I R V S * P N N R T -

      CAATTAATGAAAAAGGAAAGAGTCTACCTGTATGGGTACCAGCACATAAAGGAATTGGA
3481  -----+-----+-----+-----+-----+ 3540
      GTTAATTACTTTTTCTTTCTCAGATGGACAGTACCCATGGTTCGTGTATTTCCTTAACCT
a     Q L M K K E R V Y L S W V P A H K G I G -
b     N * * K R K E S T C H G Y Q H I K E L E -
c     I N E K G K S L P V M G T S T * R N W R -

```


Fig. 8/g

```

GGAAATGAACAAGTAGATAAATTAGTAAGTAGTGAATCAGGAAAGTGCTATTTCTAGAT
3541 -----+-----+-----+-----+-----+ 3600
CCTTTACTTGTTCATCTATTTAATCATTATCACCTTAGTCCTTTCACGATAAAGATCTA
a G N E Q V D K L V S S G I R K V L F L D -
b E M N K * I N * * V V E S G K C Y F * M -
c K * T S R * I S K * W N Q E S A I S R W -

GGAATAGATAAAGCTCAAGAAGAGCATGAAAAGTATCACAGCAATTGGAGAGCAATGGCT
3601 -----+-----+-----+-----+-----+ 3660
CCTTATCTATTTTCGAGTTCCTTCTCGTACTTTTCATAGTGTGTTAACCTCTCGTTACCGA
a G I D K A Q E E H E K Y H S N W R A M A -
b E * I K L K K S M K S I T A I G E Q W L -
c N R * S S R R A * K V S Q Q L E S N G * -

AGTGACTTTAATCTGCCACCCATAGTAGCAAAGAAATAGTGGCTAGCTGTGATCAATGT
3661 -----+-----+-----+-----+-----+ 3720
TCACTGAAATTAGACGGTGGGTATCATCGTTCCTTTATCACCGATCGACACTAGTTACA
a S D F N L P P I V A K E I V A S C D Q C -
b V T L I C H P * * Q K K * W L A V I N V -
c * L * S A T H S S K R N S G * L * S M S -

CAGCTAAAAGGAGAAGCCATGCATGGACAAGTAGACTGTAGTCCAGGGATATGGCAATTA
3721 -----+-----+-----+-----+-----+ 3780
GTGCGATTTTCTCTTCGGTACGTACCTGTTTCATCTGACATCAGGTCCCTATACCGTTAAT
a Q L K G E A M H G Q V D C S P G I W Q L -
b S * K E K P C M D K * T V V Q G Y G N * -
c A K R R S H A W T S R L * S R D M A I R -

GATTGTACACATTTAGAAGGAAAAATCATCCTGGTAGCAGTCCATGTAGCCAGTGGCTAC
3781 -----+-----+-----+-----+-----+ 3840
CTAACATGTGTAAATCTTCTTTTGTAGTAGGACCATCGTCAGGTACATCGGTACCCGATG
a D C T H L E G K I I L V A V H V A S G Y -
b I V H I * K E K S S W * Q S M * P V A T -
c L Y T F R R K N H P G S S P C S Q W L H -

ATGGAAGCAGAGGTTATCCCAGCAGAAACAGGACAAGAGACAGCATACTTTATACTAAAA
3841 -----+-----+-----+-----+-----+ 3900
TACCTTCGTCTCCAATAGGTCGTCTTTGTCTGTTCTCTGTGATGAAATATGATTTT
a M E A E V I P A E T G Q E T A Y F I L K -
b W K Q R L S Q Q K Q D K R Q H T L Y * N -
c G S R G Y P S R N R T R D S I L Y T K I -

TTAGCAGGAAGATGGCCAGTCAAAGTAATACATACAGATAATGGTAGTAATTTACCAGT
3901 -----+-----+-----+-----+-----+ 3960
AATCGTCTCTTACCGGTACGTTTCATTATGTATGTCTATTACCATCATTAAAGTGGTCA
a L A G R W P V K V I H T D N G S N F T S -
b * Q E D G Q S K * Y I Q I M V V I S P V -
c S R K M A S Q S N T Y R * W * * F H Q Y -

ACTGCAAGTTAAGGCAGCCTGTTGGTGGGCAGGTATCCAACAGGAATTTGGAATTCCTTAC
3961 -----+-----+-----+-----+-----+ 4020
TGACGTCAATTCGGTCGGACAACCACCCGTCCATAGGTTGTCTTAAACCTTAAGGGATG
a T A V K A A C W W A G I Q Q E F G I P Y -
b L Q L R Q P V G G Q V S N R N L E F P T -
c C S * G S L L V G R Y P T G I W N S L Q -

AGTCCCCAAAGTCAGGGAGTAGTAGAAGCCATGAATAAGAATTAAAGAAAATTATAGGG
4021 -----+-----+-----+-----+-----+ 4080
TCAGGGGTTTCAGTCCCTCATCATCTTCGGTACTTATTTCTTAATTTCTTTAATATCCC
a S P Q S Q G V V E A M N K E L K K I I G -
b V P K V R E * * K P * I K N * R K L * G -
c S P K S G S S R S H E * R I K E N Y R A -

CAGGTAAGAGATCAAGCTGAGCACCTTAAGACAGCAGTACTAATGGCAGTATTCATTAC
4081 -----+-----+-----+-----+-----+ 4140
GTCCATTCTAGTTCGACTCGTGAATTCGTGTCATGATTACCGTCATAAGTAAGTG
a Q V R D Q A E H L K T A V L M A V F I H -
b R * E I K L S T L R Q Q Y * W Q Y S F T -
c G K R S S * A P * D S S T N G S I H S Q -

```

19/27

Fig. 8/h

```

AATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAATAGATATA
4141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4200
TTAAAATTTTCTTTTCCCCCTAACCCCCCATGTCACGTCCCCTTTCTTATTATCTATAT
a N F K R K G G I G G Y S A G E R I I D I -
b I L K E K G G L G G T V Q G K E * * I * -
c F * K K R G D W G V Q C R G K N N R Y N -

ATAGCAACAGACATACAAACTAAAGAATTACAAAAACAGATTACAAAAATTCAAAATTTT
4201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4260
TATCGTTGCTCTGATGTTTGATTCTTAATGTTTGTCTAATGTTTAAAGTTTAAAA
a I A T D I Q T K E L Q K Q I T K I Q N F -
b * Q Q T Y K L K N Y K N R L Q K F K I F -
c S N R H T N * R I T K T D Y K N S K F S -

CGGGTTTATTACAGAGACAGCAGAGACCCAGTTGGAAGGACCAGCCAACTACTCTGG
4261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4320
GCCCAAATAATGCTCTGCTGCTCTGGGGTCAACCTTTCCTGGTGGTTTGATGAGACC
a R V Y Y R D S R D P S W K G P A K L L W -
b G F I T E T A E T P V G K D Q P N Y S G -
c G L L Q R Q Q R P Q L E R T S Q T T L E -

AAAGGTGAAGGGGAGTAATAATACAAGATAATAGTGACATAAAGGTAGTACCAAGGAGG
4321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4380
TTTCCACTTCCCGCTCATTATTATGTTCTATTATCACTGTATTCCATCATGGTTCCTCC
a K G E G A V I I Q D N S D I K V V P R R -
b K V K G Q * * Y K I I V T * R * Y Q G G -
c R * R G S N N T R * * * H K G S T K E E -

AAAGCAAAAATCATTAAAGGACTATGGAAAACAGATGGCAGGTGCTGATTGTGTGGCAGGT
4381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4440
TTTCGTTTTTAGTAATTCCTGATACCTTTTGTCTACCGTCCAGCTAACACACCGTCCA
a K A K I I K D Y G K Q M A G A D C V A G -
b K Q K S L R T M E N R W Q V L I V W Q V -
c S K N H * G L W K T D G R C * L C G R * -

AGACAGGATGAAGATTAGAACATGGAATAGTTTAGTAAACACCATATGTATGTTTCAAG
4441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4500
TCTGCTCTACTTCTAATCTGTACCTTATCAAATCATTTTGTGGTATACATACAAAGTTC
a R Q D E D * N M E * F S K T P Y V C F K -
b D R M K I R T W N S L V K H H M Y V S R -
c T G * R L E H G I V * * N T I C M F Q G -

GAGAGCTAATGGATGGTTTTACAGACATCATTATGACAGCAGACATCCAAAAGTAAGTTC
4501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4560
CTCTCGATTACCTACCAAATGTCTGTAGTAATACTGTCGTCTGTAGGTTTTCATTCAAG
a E S * W M V L Q T S L * Q Q T S K S K F -
b R A N G W F Y R H H Y D S R H P K V S S -
c E L M D G F T D I I M T A D I Q K * V Q -

AGAAGTACACATCCCATAGGAAAGGCTAAATTAGTAATAAAAACATATTGGGGGTTGCA
4561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4620
TCTTCATGTGTAGGTAATCCTTTCCGATTTAATCATTATTTTGTATAACCCCAACGT
a R S T H P I R K G * I S N K N I L G V A -
b E V H I P L G K A K L V I K T Y W G L Q -
c K Y T S H * E R L N * * * K H I G G C R -

GACAGGAGAAAGAGATCGGCATTGGGTCTGAGTCTCCATAGAATGGAGATTGAGAAG
4621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4680
CTGTCCTCTTCTCTAGCCGTAAACCCAGTACCTCAGAGGTATCTTACCTCTAACTCTTC
a D R R K R S A F G S W S L H R M E I E K -
b T G E R D R H L G H G V S I E W R L R R -
c Q E K E I G I W V M E S P * N G D * E D -

ATATACCACACAAATAGAACCTGGCCTGGCAGACCAGCTAATTCATTGTATTATTTTGA
4681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4740
TATATGGTGTGTTTATCTTGGACCGGACCGTCTGGTCGATTAAAGTAAACATAATAAACT
a I Y H T N R T W P G R P A N S F V L F * -
b Y T T Q I E P G L A D Q L I H L Y Y F D -
c I P H K * N L A W Q T S * F I C I I L I -

```

Fig. 8/i

TTGTTTTGCAGACTCTGATATAAGGAAAGCCATATTAGGACACATAGTTATTCTAGGTG
4741 -----+-----+-----+-----+-----+ 4800
AACAAAACGCTGAGACTATATTCTTTCCGTATAATCCTGTGTATCAATAAGGATCCAC
a L F C R L * Y K E S H I R T H S Y S * V -
b C F A D S D I R K A I L G H I V I P R C -
c V L Q T L I * G K P Y * D T * L F L G V -
TGACTATCAAGCAGGACATAATAAAGGTAGGATCTCTACAATACTTGGCACTGACAGC
4801 -----+-----+-----+-----+-----+ 4860
ACTGATAGTTCGTCCTGTATTATTCCATCCTAGAGATGTTATGAACCGTGAAGTGTG
a * L S S R T * * * G R I S T I L G T D S -
b D Y Q A G H N N K V G S L Q Y L A L T A -
c T I K Q D I I I R * D L Y N T W H * Q H -
ATTGATAAAACCAAAAAGATAAAGCCACCTCTGCCTAGTATCAAGAAATTAGTAGAGGA
4861 -----+-----+-----+-----+-----+ 4920
TAAGTATTTTGGTTTTTTCTATTTCCGTGGAGACGGATCATAGTTCTTTAATCATCTCCT
a I D K T K K D K A T S A * Y Q E I S R G -
b L I K P K K I K P P L P S I K K L V E D -
c * * N Q K R * S H L C L V S R N * * R I -
TAGATGGAACAATCCCCAGGAGATCAGGGGCCGAGAGGGAACCAACAATGAATGGACA
4921 -----+-----+-----+-----+-----+ 4980
ATCTACCTTGTAGGGGTCTCTAGTCCCGCGTCTCCCTTGGTGTGTACTTACCTGT
a * M E Q S P G D Q G P Q R E P H N E W T -
b R W N N P Q E I R G R R G N H T M N G H -
c D G T I P R R S G A A E G T T Q * M D T -
CTAGAGCTTCTAGAGGAGCTCAAGCAGGAAGCTGTTAGACACTTTCCTAGACCATGGCTT
4981 -----+-----+-----+-----+-----+ 5040
GATCTCGAAGATCTCCTCGAGTTCGTCCTTCGACAATCTGTGAAAGGATCTGGTACCGAA
a L E L L E E L K Q E A V R H F P R P W L -
b * S F * R S S S R K L L D T F L D H G F -
c R A S R G A Q A G S C * T L S * T M A S -
CATAGCTTAGGACAACATATCTATGAAACATATGGGGATACTTGGGCAGGAGTGAAGCC
5041 -----+-----+-----+-----+-----+ 5100
GTATCGAATCCTGTGTATAGATACTTTGTATACCCCTATGAACCCGTCCTCACCTTCGG
a H S L G Q H I Y E T Y G D T W A G V E A -
b I A * D N I S M K H M G I L G Q E W K P -
c * L R T T Y L * N I W G Y L G R S G S H -
ATAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATTTCATTTCAGAATTGGGTGTCAGCATAGC
5101 -----+-----+-----+-----+-----+ 5160
TATTATTCTTAAGACGTTGTTGACGACAAATAAGTAAAGTCTTAACCCACAGTCGTATCG
a I I R I L Q Q L L F I H F R I G C Q H S -
b * * E F C N N C C L F I S E L G V S I A -
c N K N S A T T A V Y S F Q N W V S A * Q -
AGAATAGGCATTTTGGAGACAGAGAAGAACAAGAAATGGAGCCAGTAAATCATAAATTAGA
5161 -----+-----+-----+-----+-----+ 5220
TCTTATCCGTAAACTCTGTCTCTTCTTGTCTTTACCTCGGTCAATTAGTATTTAATCT
a R I G I L R Q R R T R N G A S K S * I R -
b E * A F * D R E E Q E M E P V N H K L E -
c N R H F E T E K N K K W S Q * I I N * S -
GCCTTGGGAGCATCCAGGAAGTCAGCCTAAGACTGCTTGTAAACAGTTGCTATTGTAAAAA
5221 -----+-----+-----+-----+-----+ 5280
CGGAACCCCTCGTAGGTCCTTCAGTCGGATTCTGACGAACATTGTCAACGATAACATTTT
a A L G A S R K S A * D C L * Q L L L * K -
b P W E H P G S Q P K T A C N S C Y C K K -
c L G S I Q E V S L R L L V T V A I V K S -

Fig. 8/j

GTGCTGGTTTCATTCTGCCAAGTGTGTTTTACAGAAAAAAAGCGCTTAGGCATCTTCTATGGCAG

5281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5340
CACGACGAAAGTAACGGTTCAAACAAGTGCTTTTTCCGAATCCGTAGAAGATAACCGTC
V L L S L P S L F H E K R L R H L L W Q -
C C F H C Q V C F T K K G L G I F Y G R -
A A F I A K F V S R K K A * A S S M A G -

GAAGAAGCGAAGACAGCGACGAAGCGCTCATCGAAGCAGTGAGGATCATCAAAATCCTAT

5341 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5400
CTTCTTCGTTCTTGCTCGTCTCGCTCGAGTAGCTTCGTCACCTCTAGTAGTTTTAGGATA
E E A K T A T K R S S K Q * G S S K S Y -
K K R R Q R R S A H R S S E D H Q N P I -
R S E D S D E A L I E A V R I I K I L Y -

ATCAAAGCAGTAAGTAGTAAATGTATGCAAGCTTTAACCATTTTTAGCAATAGTAGCCTT

5401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5460
TAGTTTTCGTCATTTCATCATTTACATTACGTTTCGAAATGGTAAAATCGTTATCATCGGAA
I K A V S S K C N A S F N H F S N S S L -
S K Q * V V N V M Q A L T I L A I V A L -
Q S S K * * M * C K L * P F * Q * * P *

AGTAGTAGCAACAATAATAGCAATAGTTGTGTGGACCATAGTATTCATAGAATATAGGAA

5461 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5520
TCATCATCGTTGTTATTATCGTTATCAACACACCTGGTATCATAAGTATCTTTATATCCTT
S S S N N N S N S N S C V D H S I H R I * E -
V V A T I I A I V V W T I V F I E Y R K -
* * Q Q * * Q * L C G P * Y S * N I G K -

AATATTAAGACAGAAAAAAAAATAGACAGGTTAATTGATAGAATAAGAGAAAGAGCAGAAGA

5521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5580
TTATAATCTGCTTTTTTTATCTGTCGAATTAACATCTTATTCTCTTTCTCGTCTTCT
N I K T E K N R Q V N * * N K R K S R R -
I L R Q K K I D R L I D R I R E R A E D -
Y * D R K K * T G * L I E * E K E Q K T -

CAGTGGCAATGAGGGTGACGGGGATCAGGAAGAATTATCGGCATTTATGGAGATGGGGCA

5581 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5640
GTCACCGTTACTCCCCTGCCCCCTAGTCTTCTTAATAGCCGTAATACCTCTACCCCGT
Q W Q * G * R G S G R I I G I Y G D G A -
S G N E G D G D Q E E L S A F M E M G H -
V A M R V T G I R K N Y R H L W R W G T -

CCATGCTCCTTGGGATGTTGATGATCAGTAGTGCTGTAGGAACTTGTGGGTCACAGTCT

5641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5700
GGTACGAGGAACCCCTACAACCTACTAGTCATCAGCACATCCTTTGAACACCCAGTGTCAGA
P C S L G C * * S V V L * E T C G S Q S -
H A P W D V D D Q * C C R K L V G H S L -
M L L G M L M I S S A V G N L W V T V Y -

ATTATGGGGTACCTGTATGGAAGGGGCAACCACCCTTTATTTGTGCATCAGATGCTA

5701 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5760
TAATACCCCATGGACATACCTTTCCCGGTTGGTGGTGAATAAAACAGTAGTCTACGAT
I M G Y L Y G K G Q P P L Y F V H Q M L -
L W G T C M E R G N H H F I L C I R C * -
Y G V P V W K G A T T T L F C A S D A K -

AAGCATATGATACAGAGGTACATAATGTTTGGGCTACACATGCCTGTGTACCCGCAGACC

5761 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5820
TTCGTATACATGTCTCCATGTATTACAAACCGGATGTGTACGGACACATGGGCGTCTGG
K H M I Q R G Y I M F G L H M P V Y P Q T -
S I * Y R G T * C L G Y T C L C T R R P -
A Y D T E V H N V W A T H A C V P A D P -

Fig. 8/k

CCAACCCACAAGAAATGGTTTTGGAAAAATGTAACAGAAAAATTTAACATGTGGAAAAATG
5821 -----+-----+-----+-----+-----+ 5880
GGTTGGGTGTTCTTTACCAAAACCTTTTACATTGTCTTTTAAATTTGTACACCTTTTAC
P T H K K W F W K M * Q K I L T C G K M -
b Q P T R N G F G K C N R K F * H V E K * -
c N P Q E M V L E N V T E N F N M W K N E -

AAATGGTAAATCAGATGCAGGAAGATGTAATCAGTTTATGGGATCAAAGCCTAAAACCAT
5881 -----+-----+-----+-----+-----+ 5940
TTTACCATTTAGTCTACGTCCTTCTACATTAGTCAAATACCCTAGTTTCGGATTTTGGTA
a K W * I R C R K M * S V Y G I K A * N H -
b N G K S D A G R C N Q F M G S K P K T M -
c M V N Q M Q E D V I S L W D Q S L K P C -
GTGTAAAGTTGACCCCACTCTGTGTCACTTTAGAATGTAGAAATGTTAGCAGTAATAGTA
5941 -----+-----+-----+-----+-----+ 6000
CACATTTCAACTGGGGTGAGACACAGTGAAATCTTACATCTTTACAATCGTCATTATCAT
a V * S * P H S V S L * N V E M L A V I V -
b C K V D P T L C H F R M * K C * Q * * -
c V K L T P L C V T L E C R N V S S N S N -

ATGATACCTACCATGAGACCTACCATGAGAGCATGAAGGAAATGAAAAATTGCTCTTTCA
6001 -----+-----+-----+-----+-----+ 6060
TACTATGGATGGTACTCTGGATGGTACTCTCGTACTTCCTTTACTTTTAAACGAGAAAGT
a M I P T M R P T M R A * R K * K I A L S -
b * Y L P * D L P * E H E G N E K L L F Q -
c D T Y H E T Y H E S M K E M K N C S F N -

ATGCAACCACAGTAGTAAGAGATAGGAAGCAGACAGTGTATGCACTTTTTTATAGACTTG
6061 -----+-----+-----+-----+-----+ 6120
TACGTTGGTGTATCATCTCTATCCTTCGTCTGTACATACGTGAAAAATATCTGAAC
a M Q P Q * * E I G S R Q C M H F F I D L -
b C N H S S K R * E A D S V C T F L * T * -
c A T T V V R D R K Q T V Y A L F Y R L D -

ATATAGTACCCTTACTAAGAAGAACTATAGTGAGAATTCTAGTGAGTATTATAGATTAA
6121 -----+-----+-----+-----+-----+ 6180
TATATCATGGTGAATGATTCTTCTTGATATCACTCTTAAGATCACTATAATATCTAATT
a I * Y H L L R R T I V R I L V S I I D * -
b Y S T T Y * E E L * * E F * * V L * I N -
c I V P L T K K N Y S E N S S E Y Y R L I -

TAAATTGTAATACCTCAGCCATAACACAAGCCTGTCCAAGGTCACCTTTTGATCCAATTC
6181 -----+-----+-----+-----+-----+ 6240
ATTTAACATTATGGAGTCGGTATTGTGTTCGGACAGGTTTCAGTGAAAACTAGGTTAAG
a * I V I P Q P * H K P V Q R S L L I Q F -
b K L * Y L S H N T S L S K G H F * S N S -
c N C N T S A I T Q A C P K V T F D P I P -

CTATACACTATTGCACTCCAGCTGGTTATGCAATTCTAAAGTGTAATGATAAGATATTCA
6241 -----+-----+-----+-----+-----+ 6300
GATATGTGATAACGTGAGGTCGACCAATACGTTAAGATTTACATTACTATTCTATAAGT
a L Y T I A L Q L V M Q F * S V M I R Y S -
b Y T L L H S S W L C N S K V * * * D I Q -
c I H Y C T P A G Y A I L K C N D K I F N -

ATGGGACAGGACCATGCCATAATGTTAGCACAGTACAATGTACACATGGGATTAAGCCAG
6301 -----+-----+-----+-----+-----+ 6360
TACCCTGTCTGGTACGGTATTACAATCGTGTATGTTACATGTGTACCCTAATTCGGTC
a M G Q D H A I M L A Q Y N V H M G L S Q -
b W D R T M P * C * H S T M Y T W D * A S -
c G T G P C H N V S T V Q C T H G I K P V -

Fig. 8/1

TTGGTATCAACTCAACTACTGTTAAATGGTAGCCTAGCAGAAGGAGAAATAATAATTAGAT
6361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6420
ACCATAGTTGAGTTGATGACAATTTACCATCGGATCGTCTTCTCTTTATTATTAACTA
a W Y Q L N Y C * M V A * Q K E K * * L D -
b G I N S T T V K W * P S R R R N N N * I -
c V S T Q L L L N G S L A E G E I I I R S -

CTGAAATCTGACAAACAATGTCAAAACAATAATAGTACATCTTAATCAATCTGTAGAAA
6421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6480
GACTTTTAGACTGTTTGTACAGTTTGTATTATCATGTAGAATTAGTTAGACATCTTT
a L K I * Q T M S K Q * * Y I L I N L * K -
b * K S D K Q C Q N N N S T S * S I C R N -
c E N L T N N V K T I I V H L N Q S V E I -

TTGTATGTACAAGACCCGGCAATAATACAAGAAAAAGTATAAGGATAGGACCGAGACAAA
6481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6540
AACATACATGTTCTGGGCCGTTATTATGTTCTTTTCATATTCCTATCCTGGTCTGTTT
a L Y V Q D P A I I Q E K V * G * D Q D K -
b C M Y K T R Q * Y K K K Y K D R T R T N -
c V C T R P G N N T R K S I R I G P G Q T -

CATTCTATGCAACAGGAGACATAATAGGAGACATAAGACAAGCACATTGTAACATTAGTG
6541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6600
GTAAGATACGTTGCTCTGTATTATCTCTGTATTCTGTTCTGTAACATTGTAATCAC
a H S M Q Q E T * * E T * D K H I V T L V -
b I L C N R R H N R R H K T S T L * H * * -
c F Y A T G D I I G D I R Q A H C N I S E -

AAGATAAATGGAATGAACTTTTACAAAGGGTAAGTAAAAAATTAGCAGAACACTTCCAGA
6601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6660
TTCTATTTACCTTACTTTGAAATGTTTCCCATTCATTTTTTAATCGTCTTGTGAAGGTCT
a K I N G M K L Y K G * V K N * Q N T S R -
b R * M E * N F T K G K * K I S R T L P E -
c D K W N E T L Q R V S K K L A E H F Q N -

ATAAAACAATAAAATTTGCATCATCCTCAGGAGGGGACCTAGAAGTTACAACATAGCT
6661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6720
TATTTTGTATTTTAAACGTAGTAGGAGTCTCCCTGGATCTTCAATGTTGTGTATCGA
a I K Q * N L H H P Q E G T * K L Q H I A -
b * N N K I C I I L R R G P R S Y N T * L -
c K T I K F A S S S G G D L E V T T H S F -

TTAATTGTAGAGGAGAATTTTCTATTGTAATACATCAGGCCTGTTTAAATGGTGCATACA
6721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6780
AATTAACATCTCCTCTTAAAAAGATAACATTATGTAGTCCGGACAAATTACCACGTATGT
a L I V E E N F S I V I H Q A C L M V H T -
b * L * R R I F L L * Y I R P V * W C I H -
c N C R G E F F Y C N T S G L F N G A Y T -

CGCCTAATGGTACAAAAAGTAATCAAGCTCAATCATCACAAATCCCATGCAGAATAAAGC
6781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6840
GCGGATTACCATGTTTTTCATTAAAGTTCGAGTTAGTAGTGTAGGGTACGTCTTATTTCG
a R L M V Q K V I Q A Q S S Q S H A E * S -
b A * W Y K K * F K L N H H N P M Q N K A -
c P N G T K S N S S S I I T I P C R I K Q -

AAATTATAAATATGTGGCAGGAGGTAGGACGAGCAATGTATGCCCCCTCCCATAAAAAGGAA
6841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6900
TTTAATATTTATACACCGTCTCCTCCTGCTCGTTACATACGGGGAGGGTATTTTCCTT
a K L * I C G R R * D E Q C M P L P * K E -
b N Y K Y V A G G R T S N V C P S H K R K -
c I I N M W Q E V G R A M Y A P P I K G N -

ACATAACATGTAAATCAAATATCACAGGACTACTATTGGTACGTGATGGAGGAACAGAGC
6901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6960
TGTATTGTACATTTAGTTTATAGTGTCTGATGATAACCATGCACTACCTCCTGTCTCG
a T * H V N Q I S Q D Y Y W Y V M E E Q S -
b H N M * I K Y H R T T I G T * W R N R A -
c I T C K S N I T G L L L V R D G G T E P -

Fig. 8/m

CAAATGATACAGAGACATTAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGAACAATTGGAGAAGTG
6961 -----+-----+-----+-----+-----+ 7020
GTTTACTATGTCTCTGTAAGTCTGGACCTCCTCTATACTCCTTGTAACTCTTCAC
a Q M I Q R H S D L E E E I * G T I G E V -
b K * Y R D I Q T W R R R Y E E Q L E K * -
c N D T E T F R P G G G D M R N N W R S E -
AATTATATAAATAAAAGTGGTAGAAATTAAGCCATTGGGAGTAGACCCACTACAACAA
7021 -----+-----+-----+-----+-----+ 7080
TTAATATATTATATTACCATCTTTAATTCGGTAACCTCATCGTGGGTGATGTTGTT
a N Y I N I K W * K L S H W E * H P L Q Q -
b I I * I * S G R N * A I G S S T H Y N K -
c L Y K Y K V V E I K P L G V A P T T T K -
AAAGGAGAGTGGTGGAGAGAGAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTGTGTTCTTGGGT
7081 -----+-----+-----+-----+-----+ 7140
TTTCCTCTCACACCTCTCTCTTTTCTCGTCACCTTATCCTCGACACAAGGAACCCA
a K G E W W R E K K E Q W E * E L C S L G -
b K E S G G E R K K S S G N R S C V P W V -
c R R V V E R E K R A V G I G A V F L G F -
TCTTAGGAGTAGCAGGAAGCACTATGGGCGCGCGCTCAATAACGCTGACGGTACAGGCCA
7141 -----+-----+-----+-----+-----+ 7200
AGAATCCTCATCGTCTCTCGTGATACCGCGCGCAGTTATTGCGACTGCCATGTCCGGT
a S * E * Q E A L W A R R Q * R * R Y R P -
b L R S S R K H Y G R G V N N A D G T G Q -
c L G V A G S T M G A A S I T L T V Q A R -
GACAATTGCTGTCTGGTATAGTGCAACAGCAAAGCAATTGCTGAGGGCTATAGAAGCGC
7201 -----+-----+-----+-----+-----+ 7260
CTGTTAACGACAGACCATATCACGTTGTCGTTTCGTTAAACGACTCCCGATATCTTCGCG
a D N C C L V * C N S K A I C * G L * K R -
b T I A V W Y S A T A K Q F A E G Y R S A -
c Q L L S G I V Q Q Q S N L L R A I E A Q -
AACAGCATCTGTTGCAACTCACGGTCTGGGGCATTAAAGCAGCTCCAGACAAGAGTCTTGG
7261 -----+-----+-----+-----+-----+ 7320
TTGTCGTAGACAACGTTGAGTGCCAGACCCGTAATTGTCGAGGTCTGTTCTCAGGACC
a N S I C C N S R S G A L S S S R Q E S W -
b T A S V A T H G L G H * A A P D K S P G -
c Q H L L Q L T V W G I K Q L Q T R V L A -
CTATAGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTAGGGATTGGGGCTGCTCTGGAAGAC
7321 -----+-----+-----+-----+-----+ 7380
GATATCTTTCTATGATTTCCTAGTTGTGAGGATCCCTAAACCCGACGAGACCTTTTG
a L * K D T * R I N S S * G F G A A L E N -
b Y R K I P K G S T A P R D L G L L W K T -
c I E R Y L K D Q Q L L G I W G C S G K L -
TCATCTGCACTACTGCTGTACCTTGGAACCTCCAGTTGGAGTAACAAATCTCAAAAAGAGA
7381 -----+-----+-----+-----+-----+ 7440
AGTAGACGTGATGACGACATGGAACCTTGAGGTCAACCTCATTGTTTAGAGTTTCTCT
a S S A L L L Y L G T P V G V T N L K K R -
b H L H Y C C T L E L Q L E * Q I S K R D -
c I C T T A V P W N S S W S N K S Q K E I -
TTTGGGATAACATGACCTGGATGCAATGGGATAAGAAATTAGTAATTACACAAACACAG
7441 -----+-----+-----+-----+-----+ 7500
AAACCTATTGTACTGGACCTACGTTACCCTATTTCTTAATCATTAAATGTGTTGTGTC
a F G I T * P G C N G I K K L V I T Q T Q -
b L G * H D L D A M G * R N * * L H K H S -
c W D N M T W M Q W D K E I S N Y T N T V -
TATACAGGTTGCTTGAAGAATCGAAAACAGCAGGAAAGGAATGAAAAAGATCTATTAG
7501 -----+-----+-----+-----+-----+ 7560
ATATGTCCAACGAACTTCTAGCGTTTGGTCGTCCTTCTTACTTTTCTAGATAATC
a Y T G C L K N R K T S R K G M K K I Y * -
b I Q V A * R I A K P A G K E * K R S I S -
c Y R L L E E S Q N Q Q E R N E K D L L A -

	CATTGGACAGTGTGGAATAAATCTATGGAGTTGGTTTTGCATACAACAAATTGGCTGTGGTATA	
7561	-----+-----+-----+-----+-----+	7620
a	GTAACCTGTCAACCTTTTGTAGATACCTCAACCAAAGTGTATTGTTTAACCGCACCATAT	
b	H W T V G K I Y G V G L T * Q I G C G I -	
c	I G Q L E K S M E L V * H N K L A V V Y - L D S W K N L W S W F D I T N W L W Y I -	
	TAAAAATATTTCATAATAATAGTAGGAGGCTTGATAGGTTTAAAGAATAATTTTGTCTGTGC	
7621	-----+-----+-----+-----+-----+	7680
a	ATTTTTATAAGTATTATTATCATCCTCCGAAGTATCCAAATCTTATTAACCAACGACACG	
b	* K Y S * * * * E A * * V * E * F L L C -	
c	K N I H N N S R R L D R F K N N F C C A - K I F I I I V G G L I G L R I I F A V L -	
	TCTCTATAGTAAATAGAGTTAGGCAGGGATACTCACCTTTGTCTGTTTCAGACCCTTACCC	
7681	-----+-----+-----+-----+-----+	7740
a	AGAGATATCATTTATCTCAATCCGTCCCTATGAGTGGAAACAGCAAAGTCTGGGAATGGG	
b	S L * * I E L G R D T H L C R F R P L P -	
c	L Y S K * S * A G I L T F V V S D P Y P - S I V N R V R Q G Y S P L S F Q T L T P -	
	CGAACCAGGGGGACCCGACAGGCTCGGAAGAATCGAAGAAGAAGGTGGAAAGCAAGACA	
7741	-----+-----+-----+-----+-----+	7800
a	GCTTGGGTCCCCCTGGGCTGTCCGAGCCTTCTTAGCTTCTTCTCCACCTTTCTGTTCTGT	
b	R T Q G D P T T G S E E S K K K V E S K T -	
c	E P R G T R Q A R K N R R R G W K A R Q - N P G G P D R L G R I E E E G G K Q D R -	
	GGGACAGATCCATTGATTAGTGAACGGATTCTTAGCGCTTGCTGGGACGACCTGCCGA	
7801	-----+-----+-----+-----+-----+	7860
a	CCCTGTCTAGGTAAGCTAATCACTTGCTAAGAATCGCGAAGGACCTGCTGGACGCT	
b	G T D P F D * * T D S * A L P G T T C G -	
c	G Q I H S I S E R I L S R C L L G R P A E - D R S I R L V N G F L A L A W D D L R N -	
	ACCTGTGCCTCTTCAGCTACCACCGATTGAGGGACTTCACATTAGTGGCAGCGAGGGTGG	
7861	-----+-----+-----+-----+-----+	7920
a	TGGACACGGAGAAGTCGATGGTGCTTAAGTCTCCTGAAGTGTAAATCACCCTGCTCCCACC	
b	T C A S S A T T D * G T S H * W Q R G W -	
c	P V P L Q L P P I E G L H I S G S E G G - L C L F S Y H R L R D F T L V A A R V V -	
	TGGAACCTCTGGGACGCAATAGTCTCAGGGGACTACAGAGAGGGTGGGAAGCCCTTAAAT	
7921	-----+-----+-----+-----+-----+	7980
a	ACCTTGAAGACCCCTGCGTTATCAGAGTCCCCCTGATGTCTCTCCACCCCTCGGGAATTTA	
b	W N F W D A I V S G D Y R E G G K P L N -	
c	G T S G T Q * S Q G T T E R V G S P * I - E L L G R N S L R G L Q R G W E A L K Y -	
	ATCTGGGAAGTCTTGTGCAGTACTGGGGTCAGGAGCTAAAAAGAGTACTATTAGTCTGG	
7981	-----+-----+-----+-----+-----+	8040
a	TAGACCCTTCAGAACACGTCATGACCCAGTCTCGATTATTTCTCATGATAATCAGACC	
b	I W E V L C S T G V R S * K R V L L V W -	
c	S G K S C A V L G S G A K K E Y Y * S G - L G S L V Q Y W G Q E L K K S T I S L V -	
	TTGATACCATAGCAATAGCAGTAGCTGAAGGAACAGATAGGATTATAGAATTAGTACAAG	
8041	-----+-----+-----+-----+-----+	8100
a	AACATATGGTATCGTTATCGTTCATCGACTTCCTGTCTATCCTAATATCTTAATCATGTTT	
b	L I P * Q * Q * L K E Q I G L * N * Y K -	
c	* Y H S N S S S * R N R * D Y R I S T R - D T I A I A V A E G T D R I I E L V Q G -	
	GACTTTGTAGAGCTATCTACAGCATACCTAGAAGAATAAGACAGGGCTTTGAAGCAGCTT	
8101	-----+-----+-----+-----+-----+	8160
a	CTGAAACATCTCGATAGATGTCGATGGATCTTCTATTCTGTCCCAGAACTTCGTCGAA	
b	D F V E L S T A Y L E E * D R A L K Q L -	
c	T L * S Y L Q H T * K N K T G L * S S F - L C R A I Y S I P R R I R O G F E A A L -	

Fig. 8/o

8161 TGCAATAAAATGGGGGGCAAGTGGTCGAAAAGTAGCATAGTTGGATGGCCTGCTATAAGG 8220
-----+-----+-----+-----+-----+
a ACGTTATTTTACCCCCGTTTACCAGCTTTTCATCGTATCAACCTACCGGACGATATTC
b C N K M G G K W S K S S I V G W P A I R -
c A I K W G A S G R K V A * L D G L L * G -
Q * N G G Q V V E K * H S W M A C Y K G -

8221 GAGAGAATGAGAAGAAGTGGAGCCAGCAGCAGATGGGGTGGGAGCAGTATCTCGAGACCTG 8280
-----+-----+-----+-----+-----+
a CTCTCTTACTCTTCTTGACTCGGTCGTCGTCCTACCCACCCTCGTCATAGAGCTCTGGAC
b E R M R R T E P A A D G V G A V S R D L -
c R E * E E L S Q Q Q M G W E Q Y L E T W -
E N E K N * A S S R W G G S S I S R P G -

8281 GAAAAACATGGAGCAATCAGAGTAGCAATACAGCAGCTACTAATGAGGATTGTGCCTGG 8340
-----+-----+-----+-----+-----+
a CTTTTGTACCTCGTTAGTGCTCATCGTTATGTCGTCGATGATTACTCCTAACACGGACC
b E K H G A I T S S N T A A T N E D C A W -
c K N M E Q S R V A I Q Q L L M R I V P G -
K T W S N H E * Q Y S S Y * * G L C L A -

8341 CTGGAAGCACAAGAGGAGGGGGAGGTGGGTTTTCCAGTCAGACCTCAGGTACCTTTAAGA 8400
-----+-----+-----+-----+-----+
a GACCTTCGTGTTCTCCTCCCCCTCCACCACAAAGGTGAGTCTGAGTCCATGAAAATCT
b L E A Q E E G E V G F P V R P Q V P L R -
c W K H K R R G R W V F Q S D L R Y L * D -
G S T R G G G G G F S S Q T S G T F K T -

8401 CCAATGACTTACAAGGGAGCTGTAGATCTTAGCTTCTTTTTAAAGAAAAGGGGGGACTG 8460
-----+-----+-----+-----+-----+
a GGTACTGAATGTTCCCTCGACATCTAGAATCGAAGAAAAATTTCTTTTCCCCCTGAC
b P M T Y K G A V D L S F F L K E K G G L -
c Q * L T R E L * I L A S F * K K R G D W -
N D L Q G S C R S * L L F K R K G G T G -

8461 GAAGGGTTAATTTACTCTAAGAAAAGGCAAGAGATCCTTGATTGTGGGTCTATCACACA 8520
-----+-----+-----+-----+-----+
a CTTCCCAATTAAATGAGATTCTTTTCCGTTCTCTAGGAAGTAAACACCCAGATAGTGTG
b E G L I Y S K K R Q E I L D L W V Y H T -
c K G * F T L R K G K R S L I C G S I T H -
R V N L L * E K A R D P * F V G L S H T -

8521 CAAGGCTACTTCCCTGATTGGCACAACCTACACACCAGGACCAGGGGTCAGATTCCCACTG 8580
-----+-----+-----+-----+-----+
a GTTCCGATGAAGGGACTAACCCTGTTGATGTGTGGTCTGTCCTCCAGTCTAAGGGTGAC
b Q G Y F P D W H N Y T P G P G V R F P L -
c K A T S L I G T T T H Q D Q G S D S H * -
R L L P * L A Q L H T R T R G Q I P T D -

8581 ACTTTTGGGTGGTGCTTCAAGCTAGTACCAGTTGACCCAAGGAAGTAGAAGAGGCCAAC 8640
-----+-----+-----+-----+-----+
a TGAAAACCCACCAGAGTTTCGATCATGGTCAACTGGGTTCCCTTCATCTTCTCCGGTTG
b T F G W C F K L V P V D P R E V E E A N -
c L L G G A S S * Y Q L T Q G K * K R P T -
F W V V L Q A S T S * P K G S R R G Q R -

8641 GAGGGAGAAGACAAGTCTGCTACACCCTGTGTGCCAGCATGGAATGGAGGATGATCAC 8700
-----+-----+-----+-----+-----+
a CTCCTCTTCTGTGACGAACGATGTGGGACACACGGTCGTACCTTACCTCCTACTAGTG
b E G E D N C L L H P V C Q H G M E D D H -
c R E K T T A C Y T L C A S M E W R M I T -
G R R Q L L A T P C V P A W N G G * S Q -

8701 AGAGAAGTATTAAAGTGAAGTTTGACAGTCAACTAGCACACAGACACAGGGCCCGCGAA 8760
-----+-----+-----+-----+-----+
a TCTCTTCAATAATTCACCTTCAAACTGTGAGTGTGTCGTGTCTGTGTCCCGGGCGCTT
b R E V L K W K F D S Q L A H R H R A R E -
c E K Y * S G S L T V N * H T D T G P A N -
R S I K V E V * Q S T S T Q T Q G P R T -

Fig. 8/p

```

      CTACATCCGGAGTTTACAAAGACTGCTGACACAGAAGGGACTTTCGCGGGGACTTTCC
8761 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 8820
      GATGTAGGCCTCAAAATGTTTCTGACGACTGTGTCTTCCCTGAAAGGCGCCCTGAAAGG
a      L H P E F Y K D C * H R R D F P R G L S -
b      Y I R S F T K T A D T E G T F R G D F P -
c      T S G V L Q R L L T Q K G L S A G T F H -

      ACTGGGGCGTTCTAGGAGGTGTGGTCTGGCGGGACTGGGAGTGGTCAACCCTCAAATGCT
8821 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 8880
      TGACCCCGCAAGATCCTCCACACCAGACCGCCCTGACCCTCACCAGTTGGGAGTTTACGA
a      T G A F * E V W S G G T G S G Q P S N A -
b      L G R S R R C G L A G L G V V N P Q M L -
c      W G V L G G V V W R D W E W S T L K C C -

      GCATATAAGCAGCTGCTTTTCGCCTGTACTGGGTCTCTCTAGTCAGACCAGATCTGAGCC
8881 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 8940
      CGTATATTCGTCGACGAAAGCGGACATGACCCAGAGAGATCAGTCTGGTCTAGACTCGG
a      A Y K Q L L F A C T G S L * S D Q I * A -
b      H I S S C F S P V L G L S S Q T R S E P -
c      I * A A A F R L Y W V S L V R P D L S L -

      TGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA
8941 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9000
      ACCCTCGAGAGACCGATTGATCCCTTGGGTGACGAATTCGGAGTTATTTCGAACGGAAT
a      W E L S G * L G N P L L K P Q * S L P * -
b      G S S L A N * G T H C L S L N K A C L E -
c      G A L W L T R E P T A * A S I K L A L R -

      GGGGCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTT
9001 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9060
      CCCCAGTCTCGCCGCGGTGGCGCCACCTCGAGGTCGAAAACAAGGGAATCACTCCCAA
a      G A R A A A T A V E L Q L L F P L V R V -
b      G L E R P P P R W S S S F C S L * * G L -
c      G * S G R H R G G A P A F V P F S E G * -

      AATTGCGCGCTGGCGATC
9061 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9078
      TTAACGCGCGACCGCTAG
a      N C A L A I -
b      I A R W R -
c      L R A G D -

```

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Geneart GmbH

5

<120> Das Genom des HIV-1 Intersubtyps (C/B') und seine
Anwendungen

<130> WAG-001 PCT

10

<140> xx

<141> 2000-11-16

<150> DE 199 55 089.1

15

<151> 1999-11-16

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

20

<210> 1

<211> 9078

<212> DNA

<213> Human immunodeficiency virus

25

<400> 1

aatctctagc agtggcgccc gaacagggac ttgaaagcga aagtaagacc agaggagatc 60
tctcgacgca ggactcggct tgctgaagtg cactcggcaa gaggcgagag cggcgactgg 120
tgagtacgcc aattatatTT gactagcgga ggctagaagg agagagatgg gtgcgagagc 180
30 gtcaatatta agagggggaa aattagataa atgggaaaaa attaggTTaa ggccaggggg 240
aaagaaacac tatatgctaa aacacctagt atgggcaagc agggagctgg aaagatttgc 300
acttaaccct ggccttttag agacatcaga aggctgtaaa caaataatga aacagctaca 360
atcagctctt cagacaggaa cagaggaact tagatcatta ttcaacacag tagcaactcc 420
ctattgtgta catacagaga tagatgtacg agacaccaga gaagccttag acaagataga 480
35 ggaagaacaa aacaaaattc agcaaaaaac acagcaggca aaggaggctg acgggaaggt 540
cagtcaaaat taccctatag tacagaatct ccaagggcaa atggtacatc agcccatatc 600
acctagaact ttaaatgcat gggtaaaagt ggtagaagag aaggctttta gcccagaagt 660
aataccatg ttttcagcgt tatcagaagg agccacccca caagatttaa acaccatgct 720
aaacacagtg gggggacatc aagcagctat gcaaatatta aaagatacca tcaatgaaga 780
40 ggctgcagaa tgggatagat tacatccagt acatgcaggg cctattgcac caggccaaat 840
gagagaacca aggggaagtg acatagcagg aactactagt aacctacagg aacaaatagc 900
atggatgacg agtaaccac ctgttccagt aggagacatc tataaaagat ggataattct 960
gggattaaat aaaatagtaa gaatgtatag ccctaccagc attctggaca taaaacaagg 1020

gccaaaggaa ccctttagag actatgtaga ccggttcttt aaaactttaa gagcggaaca 1080
 agctacgcaa ggtgtaaaaa attggatgac agacaccttg ttggtccaaa atgcgaaccc 1140
 agattgtaag accattttta gagcattagg accaggggct tcaatagaag aaatgatgac 1200
 agcatgtcag ggagtgggag gacctagcca taaagcaaaa gtgttgcccg aggcaatgag 1260
 5 ccaaacaac agtgccatac tgatgcagag aagcaatttt aaaggctcta aaagaattgt 1320
 taaatgtttc aactgtggca aggaagggca catagccaga aattgcaggg cccctaggaa 1380
 aaagggtgtg tggaaatgtg gaaaagaagg acaccaaag aaagattgta ctgagagaca 1440
 ggccaatttt ttagggaaaa tctggccctc ccacaaggga gggccaggga attttcttca 1500
 gaacagacca gagccaacag ccccaccaga ggagagcttc aggtttgggg aagagacaac 1560
 10 aactccatct cagaagcagg agccaataga caaggaaacta tatcctttaa ctccctcaa 1620
 atcactcttt ggcaacgacc cctcgtcaca ataaagatag gggggcaatt aaaggaagct 1680
 ctattagata caggagcagg tgatacagta ttagaagacc tgaatttgcc agggaaatgg 1740
 aaacaaaaaa tgataggggg aattggagggt tttatcaaag taagacagta tgaacagata 1800
 cccatagaaa tttgcgga caaagctata ggtacagtat tagtaggacc tacacctgtc 1860
 15 aacataattg gaagaaatct gttgactcag cttggttgca ctttaaattt tccaatcagt 1920
 cccattgaaa ctgtaccagt aaaattaaag ccaggaatgg atggcccaa gggttaacaa 1980
 tggccattga cagaagagaa aataaaagca ttaacagcaa tttgtgatga aatggagaaa 2040
 gaaggaaaaa ttacaaaaat tgggcctgaa aatccatata acactccaat atttgccata 2100
 aaaaagaagg acagtactaa gtggagaaa ttagtagatt tcagggaact caataaaga 2160
 20 actcaagatt tttgggaagt tcaattagga ataccacacc cagcagggtt aaaaaagaaa 2220
 aaatcagtga cagtactgga tgtgggggat gcatattttt caattccttt atatgaagac 2280
 ttcaggaagt atactgcatt caccatacct agtagaaaca atgaaacacc agggattagg 2340
 tatcagtaca atgtacttcc acagggatgg aaaggatcac tagcaatatt ccaaagtagc 2400
 atgacaaaaa ccttagagcc ttttagaaaa caaatccag gcatagtatt ctatcaatac 2460
 25 atggatgatt tgtatgtagg atctgactta gagatagggc agcatagaac aaaaatagag 2520
 gaactgagac aacatttgtt gaggtgggga tttaccacac cagacaagaa acattagaaa 2580
 gaacctccat ttctttggat ggggtatgaa ctccatcctg acaaatggac agtacagcct 2640
 acacagctgc cagaaaaaga tagctggact gtcaatgata taaaaagt agtgggaaaa 2700
 ttaaactggg caagtcagat ttatcctgga attaaagtaa ggcaactttg taaactcctt 2760
 30 aggggggcca aagcactaac agacatagta ccactaactg aagaagcaga attagaattg 2820
 gcagaaaaa gggaaattct aaaagaacca gtacatggag tatactatga cccatcaaaa 2880
 gacttgatag ctgaaataca gaaacagggg caggaacaat ggacatatca aatttaccaa 2940
 gaaccattca aaaatctaaa aacaggggaag tatgcaaaaa tgaggactgc ccacactaat 3000
 gatgtaaaac aattaacaga ggctgtgcag aaaatagcca tggaaggcat agtaatatgg 3060
 35 ggaaaaactc ctaaatttag attaccatc caaaaagaaa catgggagac atggtggaca 3120
 gactattggc aagccacctg gattcctgag tgggaatttg ttaatacccc tcccttagta 3180
 aaattatggg accagctgga aaaagatccc atagtaggag tagaaacttt ctatgtagat 3240
 ggagcagcta atagggagac taaaatagga aaagcagggt atgttactga cagaggaagg 3300
 aagaaaattg tttctctaac tgaacaaca aatcagaaga ctgaattgca agcaatttgt 3360
 40 atagctttgc aagattcagg atcagaagta aacatagtaa cagattcaca gtatgcatta 3420
 gggatcattc aagcacaacc agataagagt gaatcagagt tagttaacca aataatagaa 3480
 caattaatga aaaaggaaag agtctacctg tcatgggtac cagcacataa aggaattgga 3540
 ggaaatgaac aagtagataa attagtaagt agtggaatca ggaaagtgt atttctagat 3600

ggaatagata aagctcaaga agagcatgaa aagtatcaca gcaattggag agcaatggct 3660
 agtgacttta atctgccacc catagtagca aaagaaatag tggctagctg tgatcaatgt 3720
 cagctaaaag gagaagccat gcatggacaa gtagactgta gtccagggat atggcaatta 3780
 gattgtacac atttagaagg aaaaatcatc ctggtagcag tccatgtagc cagtggctac 3840
 5 atggaagcag aggttatccc agcagaaaaca ggacaagaga cagcatactt tataactaaa 3900
 ttagcaggaa gatggccagt caaagtaata catacagata atggtagtaa tttcaccagt 3960
 actgcagtta aggcagcctg ttggtgggca ggtatccaac aggaatttgg aattccctac 4020
 agtcccaaaa gtcaggaggt agtagaagcc atgaataaag aattaaagaa aattataggg 4080
 caggtaagag atcaagctga gcaccttaag acagcagtagc taatggcagt attcattcac 4140
 10 aattttaaaa gaaaaggggg gattgggggg tacagtgcag gggaaagaat aatagatata 4200
 atagcaacag acatacaaac taaagaatta caaaaacaga ttacaaaaat tcaaaatttt 4260
 cgggtttatt acagagacag cagagacccc agttggaaag gaccagccaa actactctgg 4320
 aaaggtgaag gggcagtaat aatacaagat aatagtgcac taaaggtagt accaaggagg 4380
 aaagcaaaaa tcattaagga ctatggaaaa cagatggcag gtgctgattg tgtggcagg 4440
 15 agacaggatg aagattagaa catggaatag tttagtaaaa caccatatgt atgtttcaag 4500
 gagagctaat ggatggtttt acagacatca ttatgacagc agacatccaa aagtaagt 4560
 agaagtacac atcccattag gaaaggctaa attagtaata aaaacatatt gggggttgca 4620
 gacaggagaa agagatcggc atttgggtca tggagtctcc atagaatgga gattgagaag 4680
 atataccaca caaatagaac ctggcctggc agaccagcta attcatttgt attattttga 4740
 20 ttgttttgca gactctgata taaggaaagc catattagga cacatagtta ttcctagg 4800
 tgactatcaa gcaggacata ataataaggt aggatctcta caatacttgg cactgacagc 4860
 attgataaaa ccaaaaaaga taaagccacc tctgcctagt atcaagaaat tagtagagga 4920
 tagatggaac aatccccagg agatcagggg ccgcagaggg aaccacacaa tgaatggaca 4980
 ctagagcttc tagaggagct caagcaggaa gctgttagac actttcctag accatggctt 5040
 25 catagcttag gacaacatat ctatgaaaca tatggggata cttgggcagg agtggaagcc 5100
 ataataagaa ttctgcaaca actgctgttt attcatttca gaattgggtg tcagcatagc 5160
 agaataggca ttttgagaca gagaagaaca agaaatggag ccagtaaatc ataaattaga 5220
 gccttgggag catccaggaa gtcagcctaa gactgcttgt aacagttgct attgtaaaaa 5280
 gtgctgcttt cattgccaaag tttgtttcac gaaaaaaggc ttaggcatct tctatggcag 5340
 30 gaagaagcga agacagcgac gaagcgctca tcgaagcagt gaggatcatc aaaatcctat 5400
 atcaaagcag taagtagtaa atgtaatgca agctttaacc attttagcaa tagtagcctt 5460
 agtagtagca acaataatag caatagtgtg gtggaccata gtattcatag aatataggaa 5520
 aatattaaga cagaaaaaaa tagacagggt aattgataga ataagagaaa gagcagaaga 5580
 cagtggcaat gagggtgacg gggatcagga agaattatcg gcatttatgg agatggggca 5640
 35 ccatgctcct tgggatgttg atgatcagta gtgctgtagg aaacttgtgg gtcacagtct 5700
 attatggggg acctgtatgg aaaggggcaa ccaccacttt attttgtgca tcagatgcta 5760
 aagcatatga tacagaggta cataatgttt gggctacaca tgcctgtgta cccgcagacc 5820
 ccaaccacaca agaaatggtt ttggaaaatg taacagaaaa ttttaacatg tggaaaaatg 5880
 aaatggtaaa tcagatgcag gaagatgtaa tcagtttatg ggatcaaagc ctaaaacat 5940
 40 gtgtaaagtt gacccactc tgtgtcactt tagaatgtag aaatgttagc agtaatagta 6000
 atgataccta ccatgagacc taccatgaga gcataagga aatgaaaaat tgctctttca 6060
 atgcaaccac agtagtaaga gataggaagc agacagtgtg tgcacttttt tatagacttg 6120
 atatagtacc acttactaag aagaactata gtgagaattc tagtgagtat tatagattaa 6180

5 taaattgtaa tacctcagcc ataacacaag cctgtccaaa ggctactttt gatccaattc 6240
ctatacacta ttgcactcca gctgggttatg caattctaaa gtgtaatgat aagatattca 6300
atgggacagg accatgccat aatgttagca cagtacaatg tacacatggg attaagccag 6360
tggtatcaac tcaactactg ttaaatggta gcctagcaga aggagaaata ataattagat 6420
10 ctgaaaatct gacaaacaat gtcaaaacaa taatagtaca tcttaatcaa tctgtagaaa 6480
ttgtatgtac aagacccggc aataatacaa gaaaaagtat aaggatagga ccaggacaaa 6540
cattctatgc aacaggagac ataataggag acataagaca agcacattgt aacattagt 6600
aagataaatg gaatgaaact ttacaaaggg taagtaaaaa attagcagaa cacttccaga 6660
ataaaacaat aaaatttgca tcatcctcag gaggggacct agaagttaca acacatagct 6720
15 ttaattgtag aggagaattt ttctattgta atacatcagg cctgtttaat ggtgcatata 6780
cgccaatgg taaaaaagt aattcaagct caatcatcac aatcccatgc agaataaagc 6840
aaattataaa tatgtggcag gaggtaggac gagcaatgta tgcccctccc ataaaaggaa 6900
acataacatg taaatcaaat atcacaggac tactattggt acgtgatgga ggaacagagc 6960
caaatgatac agagacattc agacctggag gaggagatat gaggaacaat tggagaagt 7020
20 aattatataa atataaagtg gtagaaatta agccattggg agtagcacc actacaacaa 7080
aaaggagagt ggtggagaga gaaaaaagag cagtgggaat aggagctgtg ttccttgggt 7140
tcttaggagt agcaggaagc actatgggcg cggcgctaat aacgctgacg gtacaggcca 7200
gacaattgct gtctggtata gtgcaacagc aaagcaattt gctgagggt atagaagcgc 7260
aacagcatct gttgcaactc acggtctggg gcattaagca gctccagaca agagtccctg 7320
25 ctatagaaag atacctaaag gatcaacagc tcctagggat ttggggctgc tctggaaaac 7380
tcatctgcac tactgtgta ccttgaact ccagttggag taacaaatct caaaaagaga 7440
tttgggataa catgacctg atgcaatggg ataaagaaat tagtaattac acaaacacag 7500
tatacagggt gcttgaagaa tcgcaaaacc agcaggaaag gaatgaaaa gatctattag 7560
cattggacag ttgaaaaaat ctatggagt gggttgacat aacaaattgg ctgtggtata 7620
30 taaaaatatt cataataata gtaggggct tgatagggtt aagaataatt tttgctgtgc 7680
tctctatagt aaatagagt aggcagggat actcacctt gtcgtttcag acccttacc 7740
cgaaccagg gggaccgac aggctcggaa gaatcgaaga agaagggtga aagcaagaca 7800
gggacagatc cattcgatta gtgaacggat tcttagcgct tgcctgggac gacctgcgga 7860
acctgtgcct cttcagctac caccgattga gggacttcac attagtggca gcgagggtg 7920
35 tggaacttct gggacgcaat agtctcagg gactacagag aggggtggaa gcccttaaat 7980
atctgggaag tcttgtgcag tactggggtc aggagctaaa aaagagtact attagtctg 8040
ttgatccat agcaatagca gtagctgaag gaacagatag gattatagaa ttagtacaag 8100
gactttgtag agctatctac agcatacct gaagaataag acagggcttt gaagcagctt 8160
tgcaataaaa tggggggcaa gtggtcgaaa agtagcatag ttggatggcc tgctataagg 8220
40 gagagaatga gaagaactga gccagcagca gatggggtg gagcagtatc tcgagacctg 8280
gaaaaacatg gagcaatcac gagtagcaat acagcagcta ctaatgagga ttgtgcctg 8340
ctggaagcac aagaggagg ggaggtgggt tttccagtca gacctcaggt acctttaaga 8400
ccaatgactt acaagggagc ttagatctt agcttcttt taaaagaaaa ggggggactg 8460
gaagggttaa tttactctaa gaaaaggcaa gagatcctt atttgtgggt ctatcacaca 8520
caaggctact tccctgattg gcacaactac acaccaggac caggggctcag attccactg 8580
acttttgggt ggtgcttcaa gtagtacca gttgaccaa gggaagtaga agaggccaac 8640
gaggggagaag acaactgctt gctacaccct gtgtgccagc atggaatgga ggatgatcac 8700
agagaagtat taaagtggaa gtttgacagt caactagcac acagacacag ggcccgcaa 8760

ctacatccgg agttttacaa agactgctga cacagaaggg actttccgcg gggactttcc 8820
 actggggcgt tctaggaggt gtggtctggc gggactggga gtggtcaacc ctcaaatgct 8880
 gcatataagc agctgctttt cgcctgtact gggctctctt agtcagacca gatctgagcc 8940
 tgggagctct ctggctaact agggaaacca ctgcttaagc ctcaataaag cttgccttga 9000
 5 ggggctagag cggccgccac cgcggtggag ctccagcttt tgttcccttt agtgaggggt 9060
 aattgcgcgc tggcgatc 9078

<210> 2

10 <211> 4288

<212> DNA

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 2

15 gctaggtacc taatgggcgc cagggccagc atcctgaggg gcggaagct ggacaagtgg 60
 gagaagatca ggctgaggcc cggcggaag aagcactaca tgctgaagca cctggtgtgg 120
 gccagcaggg agctggagag gttcgccctg aaccccgcc tgctggagac cagcgaggcc 180
 tgcaagcaga tcataagca gctgcagagc gccctgcaga ccggcaccga ggagctgagg 240
 agcctgttca acaccgtggc caccctctac tgcgtgcaca ccgagatcga cgtgagggac 300
 20 accagggagg ccctggacaa gatcgaggag gagcagaaca agatccagca gaagaccag 360
 caggccaagg aggccgacgg caaggtagag cagaactacc ccatcgtgca gaacctgcag 420
 ggccagatgg tgcaccagcc catcagcccc aggacctga atgcatgggt gaaggtgggtg 480
 gaggagaagg ccttcagccc cgaggtagtc cccatgttca gcgcccagag cgagggcgcc 540
 acccccccagg acctgaacac catgctgaac accgtgggag gccaccaggc cgccatgcag 600
 25 atcctgaagg acaccatcaa cgaggaggcc gccgagtggt acaggtgca ccccgtagc 660
 gccggcccca tcgcccccg ccagatgagg gagcccgagg gcagcgacat cgcgggcacc 720
 accagcaacc tgcaggagca gatcgcttgg atgaccagca accccccctg gcccgtaggc 780
 gacatctaca agaggtggat catcctgggt ttaaacaaga tcgtgaggat gtacagcccc 840
 accagcatcc tggacatcaa gcagggcccc aaggagccct tcagggacta cgtcgacagg 900
 30 ttcttcaaga ccctgagggc ggagcaggcc acccagggcg tgaagaactg gatgaccgac 960
 accctgctgg tgcagaacgc caaccccgac tgcaagacca tcctgagggc cctgggcccc 1020
 ggcggccagca tcgaggagat gatgaccgac tgccagggcg tggcgggccc cagccacaag 1080
 gccaaggtgc tggccgaggc catgagccag accaacagcg ccatcctgat gcagaggagc 1140
 aacttcaagg gcagcaagag gatcgtgaag tgcttcaact gcggaagga gggccacatc 1200
 35 gccaggaact gcagggcccc caggaagaag ggctgctgga agtgcggaag ggagggccac 1260
 cagatgaagg actgcaccga gaggcaggcc aacttcctgg gcaagatctg gccagccac 1320
 aagggcgggc ccggcaactt cctgcagaac agggccgagc ccaccgcccc ccccgaggag 1380
 agcttcagggt tcgaggagga gaccaccacc cccagccaga agcaggagcc catcgacaag 1440
 gagctgtacc ccctgaccag cctgaagagc ctgttcggca acgacccag cagccaggaa 1500
 40 ttcttcaggg agaacctggc cctgccccag ggcagggcca gggagttagc cagcgagcag 1560
 accagggcca acagccccac caggggagag ctgcaggtgt ggggcaggga caacaacagc 1620
 atcagcgagg ccggcgccaa caggcagggc accatcagct tcaacttccc ccagatcacc 1680
 ctgtggcaga ggccccgtgt gaccatcaag atcgcgggc agctgaagga ggccctgctg 1740

aacaccggcg cggcgacac cgtgctggag gacctgaacc tgcccggcaa gtggaagccc 1800
 aagatgatcg gcggcatcgg cggcttcacg aaggtgaggg agtacgagca gatcccatc 1860
 gagatctgcg gccacaaggc catcggcacc gtgctggtgg gcccacccc cgtgaacatc 1920
 atcggcagga acctgctgac ccagctgggc tgcaccctga acttcccat cagcccatc 1980
 5 gagaccgtgc cgtgaagct gaagcccgcc atggacggcc ccaaggtgaa gcagtggccc 2040
 ctgaccgagg agaagatcaa ggccctgacc gccatctgcg acgagatgga gaaggaggcc 2100
 aagatcacca agatcgcccc cgagaacccc tacaacccc ccatcttcgc catcaagaag 2160
 aaggacagca ccaagtggag gaagctggtg gacttcaggg agctgaacaa gaggaccag 2220
 gacttctggg aggtgcagct gggcatcccc caccgcccgc gcctgaagaa gaagaagagc 2280
 10 gtgaccgtgc tggacgtggg cgacgcctac ttcagcatcc ccctgtacga ggacttcagg 2340
 aagtacaccg ccttcaccat cccagcagg aacaacgaga ccccgccat cagctaccag 2400
 tacaacgtgc tgcccaggg ctggaaggcc agcctggcca tcttcagag cagcatgacc 2460
 atcaggagc tgatctacag caagaagagg caggagatcc tggacctgtg ggtgtaccac 2520
 acccagggct acttccccga ctggcacaac tacaccccc gcccggcgt gaggttcccc 2580
 15 ctgaccttcg gctggtgctt caagctggtg cccgtggacc ccaggagggt ggaggaggcc 2640
 aacgaggcg aggacaactg cctgctgcac cccgtgtgcc agcacggcat ggaggacgac 2700
 cacaggagg tgctgaagtg gaagttcgac agccagctgg cccacaggca cagggccagg 2760
 gagctgcacc ccgagttcta caaggactgc atggcgcgca agtgaggcaa gagcagcatc 2820
 gtgggctggc ccgccatcag ggagaggatg aggaggaccg agcccggcg cgacggcgtg 2880
 20 ggcgcgtga gcaggacct ggagaagcac ggcgccatca ccagcagcaa caccgccgcc 2940
 accaacgagg actgcgcctg gctggaggcc caggaggagg gcgagggtgg cttccccgtg 3000
 agggcccagg tgcccctgag gcccatgacc tacaaggcg cctggacct gagcttcttc 3060
 ctgaaggaga agggcgccct ggaggccctg aggcagcacc tgctgagggtg gggcttcacc 3120
 acccccgaca agaagcacca gaaggagccc ccttctctgt ggatgggcta cgagctgcac 3180
 25 cccgacaagt ggaccgtgca gccaccag ctgcccgaga aggacagctg gaccgtgaac 3240
 gacatccaga agctggtggg caagctgaac tgggcccagcc agatctaccc cggcatcaag 3300
 gtgaggcagc tgtgcaagct gctgaggggc gccaaaggcc tgaccgacat cgtgcccctg 3360
 accgaggagg ccgagctgga gctggccgag aacagggaga tcctgaagga gcccgctgcac 3420
 ggcgtgtact acgaccccag caaggacctg atcgcggaga tccagaagca gggccaggag 3480
 30 cagtggacct accagatcta ccaggagccc ttcaagaacc tgaagaccgg caagtacgcc 3540
 aagatgagga ccgcccacac caacgacgtg aagcagctga ccgaggccgt gcagaagatc 3600
 gccatggagg gcatcgtgat ctggggcaag acccccaagt tcaggctgcc catccagaag 3660
 gagacctggg agacctggtg gaccgactac tggcaggcca cctggatccc cgagtgggag 3720
 ttcgtgaaca cccctccct ggtgaagctg tggatcagc tggagaagga ccccatcgtg 3780
 35 ggcgtggaga ccttctacgt ggacggcgcc gccaaaggag agaccaagat cggcaaggcc 3840
 ggctacgtga ccgacagggg caggagaag atcgtgagcc tgaccgagac caccaaccag 3900
 aagaccgagc tgcaggccat ctgcatcgcc ctgcaggaca gcggcagcga ggtgaacatc 3960
 gtgaccgaca gccagtagc cctgggcatc atccaggccc agcccgacaa gagcgagagc 4020
 gagctggtga accagatcat cgagcagctg atgaagaagg agagggtgta cctgagctgg 4080
 40 gtgcccggc acaaggccat cggcggaac gagcaggtg acaagctggt gagcagcggc 4140
 atcaggaagg tgctgaagac cctggagccc ttcaggaagc agaaccccg catcgtgatc 4200
 taccagtaca tggacgacct gtacgtgggc agcgacctg agatcggcc gcacaggacc 4260
 aagtaaagat ctctcagga gctcaagc 4288

<210> 3

<211> 2605

5 <212> DNA

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 3

```

gcgggcgggta ccgaattcgc cgccagcatg gacagggcca agctgctgct gctgctgctg 60
10 ctgctgctgc tgccccaggc ccaggccgtg ggcaacctgt gggtgaccgt gtactacggc 120
gtgcccgtgt ggaagggcgc caccaccacc ctgttctgcg ccagcgacgc caaggcctac 180
gacaccgagg tgcacaacgt gtggggccacc cagcctgcg tgcccgccga cccaacccc 240
caggagatgg tgtgagaa cgtgaccgag aacttcaaca tgtggaagaa cgagatggtg 300
aaccagatgc aggaggacgt catcagcctg tgggaccaga gcctgaagcc ctgctggaag 360
15 ctgaccccc tgtgctgac cctggagtgc aggaacgtga gcagcaacag caacgacacc 420
taccacgaga cctaccacga gagcatgaag gagatgaaga actgcagctt caacgccacc 480
accgtggtga gggacaggaa gcagaccgtg tacgccctgt tctacaggct ggacatcgtg 540
cccctgacca agaagaacta cagcgagaac agcagcgagt actacaggct gatcaactgc 600
aacaccagcg ccatcaccca ggcctgcccc aaggtgacct tcgaccccat ccccatccac 660
20 tactgcaccc ccgcccggta cgccatcctg aagtgaacg acaagatctt caacggcacc 720
ggcccctgcc acaacgtgag caccgtgcag tgcaccacg gcacaaagcc cgtggtgagc 780
acccagctgc tgtgaaacg cagcctggcc gagggcgaga tcatcatcag gagcgagaac 840
ctgaccaaca acgtgaaaac catcatcgtg cacctgaacc agagcgtgga gatcgtgtgc 900
accaggcccc gcaacaacac caggaagagc atcaggatcg gcccggcca gaccttctac 960
25 gccaccggcg acatcatcgg cgacatcagg caggcccaact gcaacatcag cgaggacaag 1020
tggaacgaga ccctgcagag ggtgagcaag aagcttgccg agcacttcca gaacaagacc 1080
atcaagttcg ccagcagcag cggcggcgac ctggaggtga ccaccacag cttcaactgc 1140
aggggcgagt tcttctactg caacaccagc ggcctgttca acggcgccca ccccccaac 1200
ggcaccaaga gcaacagcag cagcatcatc accatccctc gcaggatcaa gcagatcatc 1260
30 aacatgtggc aggaggtggg cagggccatg tacgcccctc ccatcaaggg caacatcacc 1320
tgcaagagca acatcacccg cctgctgctg gtgagggacg gcggcaccga gccaacgac 1380
accgagacct tcaggccccg cggcggcgac atgaggaaca actggaggag cgagctgtac 1440
aagtacaagg tgggtgagat caagcccctg ggcgtggccc ccaccaccac caagaggagg 1500
gtggtggaga gggagaagag ggccgtgggc atcggcgccc tgttcctggg cttcctgggc 1560
35 gtggccggca gcaccatggg cgccgccagc atcacctga ccgtgcaggc caggcagctg 1620
ctgagcggca tcgtgcagca gcagagcaac ctgctgaggg ccatcgaggc ccagcagcac 1680
ctgctgcagc tgaccgtgtg gggcatcaag cagctgcaga ccagggtgct ggccatcgag 1740
aggtaacctg aggaccagca gctgctgggc atctggggct gcagcggcaa gctgatctgc 1800
accaccgccc tgccctggaa cagcagctgg agcaacaaga gccagaagga gatctgggac 1860
40 aacatgacct ggatgcagtg ggacaaggag atcagcaact acaccaacac cgtgtacagg 1920
ctgctggagg agagccagaa ccagcaggag aggaacgaga aggacctgct ggccctggac 1980
agctggaaga acctgtggag ctggttcgac atcaccaact ggctgtggta catcaagatc 2040
ttcatcatca tcgtgggcgg cctgatcggc ctgaggatca tcttcgccgt gctgagcatc 2100

```

gtgaacaggg tgaggcaggg ctacagcccc ctgagcttcc agaccctgac cccaacccc 2160
ggcgccccg acaggctggg caggatcgag gaggagggcg gcaagcagga caggacagg 2220
agcatcaggc tggatgaacgg cttcctggcc ctggcctggg acgacctgag gaacctgtgc 2280
ctgttcagct accacaggct gagggacttc accctggtgg ccgccagggt ggtggagctg 2340
5 ctgggcagga acagcctgag gggcctgcag aggggctggg aggccctgaa gtacctgggc 2400
agcctggtgc agtactgggg ccaggagctg aagaagagca ccatcagcct ggtggacacc 2460
atcgccatcg ccgtggccga gggcacccgac aggatcatcg agctggtgca gggcctgtgc 2520
agggccatct acagcatccc caggaggatc aggcagggct tcgaggccgc cctgcagtga 2580
taaagatctc tcgaggagct caagc 2605

10